

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

DHENISE MIKAELLY MENESES DE ARAÚJO

**O USO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COMO ALTERNATIVA PARA  
DESCONTAMINAÇÃO DE FRAGMENTOS DE PELE DESTINADOS A  
TRANSPLANTES: MODELO EXPERIMENTAL EM PELE DE SUÍNOS**

São José dos Campos, SP

2020

DHENISE MIKAELLY MENESES DE ARAÚJO

**O USO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COMO ALTERNATIVA PARA  
DESCONTAMINAÇÃO DE FRAGMENTOS DE PELE DESTINADOS A  
TRANSPLANTES: MODELO EXPERIMENTAL EM PELE DE SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins.

São José dos Campos, SP

2020

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Araújo, Dhenise Mikaelly Meneses de  
O uso da inativação fotodinâmica como alternativa para descontaminação de fragmentos de pele destinados a transplantes : modelo experimental em pele de suínos / Dhenise Mikaelly Meneses de Araújo; orientador, Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins. - São José dos Campos, SP, 2020.

1 CD-ROM, 77 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Doador de Tecido. 4. Microbiologia. 5. Saúde. I. Martins, Rodrigo Alvaro Brandão Lopes , orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Dhenise Mikaelly Meneses de Araújo, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 21 de Dezembro de 2020.

*Dhenise Mikaelly Meneses de Araújo*

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 13 / 11 / 2020

Dedico este trabalho a minha mãe Iolete, que se dedicou para me proporcionar a riqueza dos estudos, que me apoiou e incentivou em todas as etapas da minha vida. Sempre ao meu lado, me dando todo o suporte e carinho necessário para o meu crescimento. Esse trabalho é para você com meu imenso amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer significa mostrar ou manifestar gratidão, render graças; penhorar e reconhecer. Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, choros, alegrias e muitos percalços pelo caminho, é imprescindível agradecer as pessoas que estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos, que foram indispensáveis e me ajudaram diretamente ou indiretamente nessa longa caminhada.

Agradeço a Deus, por me conceder saúde e sabedoria para seguir sempre em frente. Obrigada por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos. A ti, Senhor, toda honra e toda a glória.

Aos meus pais, Iolete e Juvenil, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Em especial minha mãe Iolete, que sem ela não teria chegado até aqui, me incentivou e acreditou em mim, e não mediu esforços para a concretização dos meus sonhos. Sem vocês, nada seria possível. Amo vocês com amor eterno!

A minha irmã Dheyne, minhas queridas sobrinhas Deborah e Cibely por serem meu porto seguro e sempre quando estava triste vocês me faziam sorrir.

Ao meu noivo Bruno, que desde o início me incentivou, quando eu nem conhecia direito o mesmo, me mostrou a oportunidade de tentar seleção de mestrado no estado de São Paulo. Que sempre me motivou em todos os momentos, que não me deixou desistir, que me puxava da cama para estudar e se fazia de companhia nas longas noites de estudo.

Não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Professor Dr. Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins, pois sem ele não estaria aqui concluindo o meu mestrado. Rodrigo além de orientador é um ser que se preocupa com o próximo, com o bem-estar dos seus alunos e é uma pessoa de uma eterna admiração. Meu agradecimento é enorme pelo o que esse homem fez por mim, primeiramente viu a minha dificuldade de viajar de São Paulo a São José dos Campos, e a minha necessidade de trabalhar e com isso voluntariamente buscou que eu conseguisse fazer a minha pesquisa em São Paulo. Obrigado por toda a paciência, empenho que sempre me orientou neste trabalho. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio.

Agradeço imensamente a Professora Dra. Martha Simões Ribeiro, chefe do laboratório de terapia óptica do IPEN-CNEN/SP, pela oportunidade e conhecimento

passado e pela acolhida carinhosa no seu laboratório, na qual me orientou e discutiu comigo a melhor metodologia, me forneceu todos os materiais e conhecimentos necessários para a realização dessa pesquisa. Sou eternamente grata por toda ajuda e apoio que você me deu. Muito obrigada por tudo.

A Tânia, que me ajudou absolutamente em tudo, me apresentou o laboratório, a construir a metodologia, me acompanhou no meu primeiro experimento me direcionando da melhor forma possível, agradeço aos puxões de orelha que foram essenciais para o meu crescimento. Agradeço também ao Saulo que me ajudou nos primeiros experimentos da minha pesquisa e das conversas extrovertidas que tivemos, ao Lucas por todo o treinamento do OCT. Obrigada por todo o carinho de vocês e paciência.

Ao professor Dr. Nelson Jorge Carvalho Batista, que me inspirou a ingressar na pesquisa desde a graduação, sempre foi um grande exemplo para mim, e hoje agradeço por ter me incentivado a seguir no caminho da pós-graduação.

As minhas chefes Marina, Andreza e Juliana, por terem entendido muitas vezes a minha necessidade de ausência no meu trabalho e por me incentivarem a seguir em frente, obrigada por tudo.

Aos meus amigos de Piripiri e Teresina/PI, que Deus colocou em meu caminho, mesmo com a distância, sempre se fizeram presentes na minha vida e estarão sempre em meu coração. Obrigada pelo companheirismo, apoio e amizade incondicional. Amo vocês!

Ao meu primo Hisley que me ajudou nos cálculos matemáticos e esclareceu minhas dúvidas, o meu muito obrigada.

A todos os amigos de laboratório da UNIVAP, em especial a Fran e David, que sempre estiveram comigo nos melhores e piores momentos, nas madrugadas de estudo, no desespero das provas, na recepção acolhedora na casa da Fran. Vocês foram essenciais para toda a minha jornada até aqui.

Ao meu amigo e colega de mestrado Sérgio, por ajudar-me e transmitir todo o seu conhecimento em estatística, você foi extremamente importante para a realização da análise dos meus dados. Obrigada por todo o conhecimento passado e ajuda.

Agradeço a UNIVAP e a todos professores pelos ensinamentos. Ao IPEN por ter me concedido a permissão de realizar os experimentos, e a CAPES pelo financiamento da bolsa.

As marmitas da Dona Maria, que não me deixaram passar fome na correria do laboratório até o trabalho. Obrigada pela agilidade na entrega.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectualmente e emocionalmente.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

**Arthur Schopenhauer**

## RESUMO

A cobertura temporária por pele biológica ou sintética é importante para a cura completa e mais rápida de queimaduras e outros defeitos de pele. Atualmente é utilizada a radioesterilização para garantir a qualidade dos tecidos usados em transplantes e outras aplicações clínicas. Alterações morfológicas e funcionais no tecido podem ser devido à absorção da energia ionizante liberada durante a radiação, além de acarretar danos ao profissional habilitado, como também o alto custo empregado nessa técnica. Diferentemente a inativação fotodinâmica mostra evidências de ser viável, tem baixo custo e com danos mínimos à saúde do profissional que está operando. Então levantamos a questão, a utilização da inativação fotodinâmica pode ser uma alternativa em banco de tecidos para descontaminação de pele? A inativação fotodinâmica é uma abordagem multifatorial que envolve três componentes principais, fotossensibilizador, luz e oxigênio, e tem sido utilizada como um método alternativo para erradicar microrganismos patogênicos, como bactérias e fungos. Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da inativação fotodinâmica na pele suína, visando o seu uso para descontaminação da pele destinadas a transplantes. Foram utilizados um total de 47 fragmentos de pele suína com dimensões de tamanho 1x1 cm, provenientes da região da orelha do suíno. Foi realizado o experimento em duas etapas, sendo diluído o azul de metileno na água destilada estéril a partir de 10 milimolar para concentração de 50, 75 e 100 micromolar na primeira etapa e 12,5 e 25 micromolar na segunda etapa. As placas tiveram um tempo de pré-irradiação de 20 minutos. Para este trabalho foi utilizado o equipamento LEDbox, emitindo 660 nm. As placas foram expostas à radiação durante um período de 20 minutos. Foi adotada a diluição seriada de 1:10 e o método de escorrimento na placa conforme adaptação da metodologia de Tippelskircha *et al.* (2018). Após 24 h de incubação, as placas foram retiradas da incubadora para fazer a contagem das unidades formadoras de colônias. Para a análise morfológica foi utilizada a tomografia por coerência óptica. Os resultados obtidos apontam que os grupos das concentrações de azul de metileno de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ), do grupos das concentrações de 75 e 100  $\mu\text{M}$ , sendo os grupos das concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  apresentaram-se uma maior eficácia na redução das UFCs. As imagens da tomografia de coerência óptica mostraram que é possível observar a camada do epitélio nos diferentes grupos, sem alteração ou deformação em comparação com a pele do grupo controle. A literatura apresenta poucos estudos voltados na área e com isso houve uma dificuldade maior e limitação no desenvolvimento da metodologia. Os resultados obtidos são conflitantes, pois demonstram o potencial da inativação fotodinâmica e do azul de metileno isolado, para a descontaminação da pele, embora haja a necessidade de mais ensaios laboratoriais para desempenhar uma maior inativação dos microrganismos na pele. É um estudo inovador, teve como objetivo estabelecer um modelo de protocolo de baixo custo para investigação de descontaminação da pele com o uso da inativação fotodinâmica em modelo animal. A metodologia foi bem definida e detalhada, sendo possível a repetição de mais testes, e foi alcançado objetivo de estabelecer um modelo de procedimento operacional padrão para a realização de descontaminação da pele.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica. Modelo Animal. Doador de Tecido. Microbiologia. Saúde.

# THE USE OF PHOTODYNAMIC INACTIVATION AS AN ALTERNATIVE FOR DECONTAMINATION OF SKIN FRAGMENTS INTENDED FOR TRANSPLANTS: EXPERIMENTAL MODEL IN SWINE SKIN

## ABSTRACT

Temporary coverage by biological or synthetic skin is important for the complete and faster healing of burns and other skin defects. Currently, radio-sterilization is used to ensure the quality of tissues used in transplants and other clinical applications. Morphological and functional changes in the tissue may be due to the absorption of ionizing energy released during radiation, in addition to causing damage to the qualified professional, as well as the high cost employed in this technique. In contrast, photodynamic inactivation shows evidence of being viable, has low cost and has minimal damage to the health of the professional who is operating. So we raised the question, can the use of photodynamic inactivation be an alternative in a tissue bank for skin decontamination? Photodynamic inactivation is a multifactorial approach that involves three main components, photosensitizer, light and oxygen, and has been used as an alternative method to eradicate pathogenic microorganisms, such as bacteria and fungi. This study aims to evaluate the effects of photodynamic inactivation on swine skin, aiming at its use for skin decontamination for transplantation. A total of 47 porcine skin fragments with dimensions of 1x1 cm were used, from the region of the pig's ear. The experiment was carried out in two stages, with methylene blue diluted in sterile distilled water from 10 millimolar to a concentration of 50, 75 and 100 micromolar in the first stage and 12.5 and 25 micromolar in the second stage. The plates had a pre-irradiation time of 20 minutes. For this work, the LEDbox equipment, emitting 660 nm, was used. The plates were exposed to radiation for a period of 20 minutes. The serial dilution of 1:10 was adopted and the method of draining on the plate as adapted from the methodology of Tippelskircha et al. (2018). After 24 h of incubation, the plates were removed from the incubator to count the colony-forming units. Optical coherence tomography was used for morphological analysis. The results obtained show that the groups of concentrations of methylene blue of 12.5 and 25  $\mu\text{M}$  are statistically different ( $p < 0.05$ ), from the groups of concentrations of 75 and 100  $\mu\text{M}$ , being the groups of concentrations of 12.5 and 25  $\mu\text{M}$  more effective in reducing CFUs. The optical coherence tomography images showed that it is possible to observe the epithelium layer in the different groups, without alteration or deformation in comparison with the skin of the control group. The literature presents few studies focused on the area and with that there was a greater difficulty and limitation in the development of the methodology. The results obtained are conflicting, as they demonstrate the potential of photodynamic inactivation and isolated methylene blue, for skin decontamination, although there is a need for more laboratory tests to perform a greater inactivation of microorganisms in the skin. It is an innovative study, aimed at establishing a low-cost protocol model for investigating skin decontamination with the use of photodynamic inactivation in an animal model. The methodology was well defined and detailed, making it possible to repeat more tests, and the objective was achieved to establish a standard operating procedure model for performing skin decontamination.

**Keywords:** Photodynamic Therapy. Animal Model. Tissue Donor. Microbiology. Health.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - A pele e seus anexos.....	21
<b>Figura 2</b> - Microrganismos presentes na pele. ....	23
<b>Figura 3</b> - Distribuição topográfica de reinos microbianos, bactérias e fungos em diferentes locais da pele do corpo humano.....	23
<b>Figura 4</b> - Doador de pele humana: aspecto da região doadora após a retirada.....	26
<b>Figura 5</b> - Pele humana em malha recuperada para uso em transplantes. ....	28
<b>Figura 6</b> - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana. ....	31
<b>Figura 7</b> - Recorte dos fragmentos de pele. ....	38
<b>Figura 8</b> - Acondicionamento dos recortes de pele. ....	39
<b>Figura 9</b> - Preparação das amostras para irradiação. ....	41
<b>Figura 10</b> - Distribuição dos grupos no escuro e TFD na placa de 24 poços.....	43
<b>Figura 11</b> - LEDbox 660nm (BioLambda, Brasil).....	44
<b>Figura 12</b> - Caixa de diodo emissor de luz vermelha (LED) em funcionamento. ....	45
<b>Figura 13</b> - Distribuição do volume de PBS em cada tubo falcon. ....	46
<b>Figura 14</b> - Preparação final da amostra. ....	47
<b>Figura 15</b> - Esquema representativo da diluição seriada dos grupos experimentais.	48
<b>Figura 16</b> - Preparação das amostras para a incubação. ....	48
<b>Figura 17</b> - Placas de petri dispostas em grupos na incubadora. ....	49
<b>Figura 18</b> - Placas de Petri semeada após as 24 horas de incubação. ....	49
<b>Figura 19</b> - Equipamento de OCT. ....	50
<b>Figura 20</b> - Crescimento bacteriano e fúngico da pele controle. ....	53
<b>Figura 21</b> - Crescimento bacteriano e fúngico da pele irradiada a luz. ....	53
<b>Figura 22</b> - Crescimento bacteriano e fúngico da pele em contato somente com o Fotossensibilizador azul de metileno nos grupos de 75 e 100 $\mu$ M.....	54
<b>Figura 23</b> - Crescimento bacteriano e fúngico da pele com a Terapia Fotodinâmica nos grupos de 50,75 e 100 $\mu$ M.....	54
<b>Figura 24</b> - Crescimento bacteriano e fúngico da pele em contato somente com o Fotossensibilizador azul de metileno nos grupos de 12,5 e 25 $\mu$ M.....	55
<b>Figura 25</b> - Crescimento bacteriano e fúngico da pele com a Terapia Fotodinâmica nos grupos de 12,5 e 25 $\mu$ M.....	55
<b>Figura 26</b> - Análise da fração média do crescimento de bactérias.....	61
<b>Figura 27</b> - Análise da fração média do crescimento de fungos. ....	62

<b>Figura 28</b> - Análise da fração média do crescimento de bactérias.....	63
<b>Figura 29</b> - Análise da fração média do crescimento de fungos. ....	64
<b>Figura 30</b> - Imagens do OCT nos grupos controle e luz.....	65
<b>Figura 31</b> - Imagens do OCT dos grupos: AM 75 $\mu$ M, PDT 75 $\mu$ M, AM 100 $\mu$ M e PDT 100 $\mu$ M. ....	66
<b>Figura 32</b> - Coloração azulada da pele após a experimentação. ....	67
<b>Figura 33</b> - Coloração da pele após as 48 horas em solução de PBS.....	68



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Esquema da divisão dos grupos experimentais da primeira etapa. ....	42
<b>Tabela 2</b> - Esquema da divisão dos grupos experimentais da segunda etapa. ....	43
<b>Tabela 3</b> - Esquema dos grupos da primeira etapa com os respectivos valores de massa e volumes de PBS utilizados para a preparação final da solução.....	45
<b>Tabela 4</b> - Esquema dos grupos da segunda etapa com os respectivos valores de massa e volumes de PBS utilizados para a preparação final da solução.....	46
<b>Tabela 5</b> - Distribuição da contagem de UFCs para bactéria (BHI), colunas com dados de diluição, gota( $\mu\text{L}$ ), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 75 e 100 $\mu\text{M}$ . ....	56
<b>Tabela 6</b> - Distribuição da contagem de UFCs para fungo (SB), colunas com dados de diluição, gota( $\mu\text{L}$ ), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 75 e 100 $\mu\text{M}$ . ....	57
<b>Tabela 7</b> - Distribuição da contagem de UFCs para bactéria (BHI), colunas com dados de diluição, gota( $\mu\text{L}$ ), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 12,5 e 25 $\mu\text{M}$ . ....	58
<b>Tabela 8</b> - Distribuição da contagem de UFCs para fungo (SB), colunas com dados de diluição, gota( $\mu\text{L}$ ), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 12,5 e 25 $\mu\text{M}$ .....	59
<b>Tabela 9</b> - Média e desvio padrão de UFCs de todos os grupos estudados. ....	59

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Características da orelha do suíno.....	38
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIEA</b>	Agencia Internacional de Energia Atômica
<b>AM</b>	Azul de Metileno
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>TFDa</b>	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
<b>BHI</b>	Ágar Brain Heart Infusion
<b>C</b>	Concentração
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CLA-IPEN</b>	Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
<b>Cm</b>	Centímetros
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>e<sup>-</sup></b>	Elétron
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FS</b>	Fotossensibilizador
<b>FBM</b>	Fotobiomodulação
<b>g</b>	Grama
<b>G</b>	Grupo
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HIV</b>	Acquired immunodeficiency Syndrome
<b>ICHC</b>	Instituto Central do Hospital das Clínicas
<b>IFDa</b>	Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana
<b>IPEN</b>	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
<b>J/cm<sup>2</sup></b>	Joule por Centímetro Quadrado
<b>kGy</b>	kilogray
<b>Laser</b>	Light amplification by stimulated emission of radiation
<b>LED</b>	Light Emitting Diode
<b>LIP</b>	Luz Intensa Pulsada
<b>ME</b>	Morte Encefálica
<b>m<sup>2</sup></b>	Metro Quadrado

<b>Min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MW</b>	Megawatt
<b>mW/cm<sup>2</sup></b>	Miliwatt por Centímetro Quadrado
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>n</b>	Quantidade da Amostra
<b>nm</b>	Nanometro
<b>nº</b>	Número
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OCT</b>	Tomografia De Coerência Óptica
<b>OH</b>	Hidroxila
<b>Pbm</b>	Photobiomodulation
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)
<b>PDT</b>	Photodynamic Therapy
<b>PIT</b>	Tempo de Pré- Irradiação
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada.
<b>SB</b>	Ágar Sabouraud
<b>SNT</b>	Sistema Nacional de Transplantes
<b>TFD</b>	Terapia Fotodinâmica
<b>Testes t</b>	Student (Teste de Hipótese)
<b>UFC</b>	Unidade formadora de Colônia
<b>UFCs</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>V</b>	Volume
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>%</b>	Porcentagem
<b><sup>137</sup>Cs</b>	Césio-137
<b><sup>60</sup>Co</b>	Cobalto - 60

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1 Histologia da pele.....	21
2.2 Microbiologia da pele.....	22
2.3 Doadores de órgãos e tecidos humanos .....	24
2.4 Doador de pele e Banco de tecidos.....	25
2.5 Métodos atuais de descontaminação microbiana da pele .....	28
2.6 Terapia Fotodinâmica .....	29
2.7 Mecanismo de ação da TFD .....	30
2.8 Fontes de Luz .....	32
2.9 Agentes Fotossensibilizantes .....	33
2.10 Azul de Metileno .....	33
2.11 Modelo Animal .....	34
<b>3 HIPÓTESE .....</b>	<b>35</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Objetivo geral .....	36
4.2 Objetivos específicos .....	36
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 Protocolo Experimental no modelo de pele de suínos.....	37
5.2 Aspectos éticos .....	37
5.3 Amostras .....	37
5.4 Preparo das soluções .....	39
5.5 Divisão dos Grupos .....	41
5.6 Fontes de Luz .....	43
5.7 Preparo da solução final para o plaqueamento .....	45
5.8 Análise Quantitativa: diluição, plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) .....	47
5.9 Análise Morfológica .....	50
5.10 Análise Estatística.....	50
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
6.1 Análise da variação das UFCs nos meios de cultura dos grupos experimentais e controles.....	50

<b>6.2 Distribuição das contagens de UFCs para fungos e bactérias de todos os grupos.....</b>	<b>54</b>
<b>6.3 Análise do crescimento bacteriano dos grupos Controle, Luz, AM 75 µM, PDT 75 µM, AM 100 µM e PDT 100 µM.....</b>	<b>58</b>
<b>6.4 Análise do crescimento fúngico dos grupos Controle, Luz, AM 75 µM, PDT 75 µM, AM 100 µM e PDT 100 µM.....</b>	<b>59</b>
<b>6.5 Análise do crescimento bacteriano dos grupos Controle, AM 12,5 µM, PDT 12,5 µM, AM 25 µM e PDT 25 µM.....</b>	<b>60</b>
<b>6.6 Análise do crescimento fúngico dos grupos Controle, AM 12,5 µM, PDT 12,5 µM, AM 25 µM e PDT 25 µM.....</b>	<b>61</b>
<b>6.7 Caracterização das amostras por OCT.....</b>	<b>62</b>
<b>6.8 Coloração da pele após o experimento.....</b>	<b>65</b>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cobertura temporária por pele biológica ou sintética é importante para a cura completa e mais rápida de queimaduras e outros defeitos de pele. Um passo importante no processamento de tecidos biológicos é a esterilização para impedir a transferência de doenças infecciosas (MRÁZOVÁ *et al.*, 2016).

Mais de 70% das queimaduras envolvem as extremidades, um número crescente de pacientes requer tratamento de queimaduras ou lesões. Embora o tecido autólogo (fazem parte do corpo do próprio paciente), forneça uma ferramenta reconstrutiva para esses pacientes, isso resulta em um defeito no local doador em um paciente já devastado. Os pacientes com grandes queimaduras e feridas cutâneas geralmente carecem de tecido suficiente no local doador para permitir a cobertura do autoenxerto cutâneo de todas as áreas afetadas. As técnicas atuais disponíveis para grandes queimaduras e feridas cutâneas incluem aloenxerto cadavérico, materiais sintéticos e autoenxertos epidérmicos cultivados. Sendo necessário a transplantação desse tecido e conseqüentemente um processo de descontaminação do tecido doador, atualmente a radiação ionizante é uma alternativa para descontaminação da pele destinadas a transplante (SHAILESH AGARWAL *et al.*, 2015).

A pele é um órgão complexo que desempenha mecanismo na barreira imunológica à doença. A estrutura e composição da pele humana não é uniforme em todo o corpo e tem diferenças regionais significativas em espessura, presença de folículos capilares e colágeno. A pele suína é talvez o tecido animal mais utilizado na pesquisa biomédica e medicina regenerativa como modelo de pesquisa e como fonte de materiais biológicos, existem semelhanças notáveis entre a pele suína e humana com relação a propriedade como absorção percutânea. No entanto, é importante perceber que as mesmas variações regionais presentes na pele humana também estão presentes na pele suína (TURNER; PEZZONE; BADYLAK, 2014).

A luz pode interagir com a matéria de diferentes maneiras, e alguns efeitos podem alterar a sua propagação. O tecido biológico é constituído por elevado número de moléculas que interagem diferentemente com a luz. As interações da luz com o tecido biológico são determinadas pelas composições químicas e estruturais do tecido e os principais tipos de interação são: reflexo, espalhamento, absorção e transmissão. Quando a luz é aplicada em tecidos biológicos há uma série de mecanismos que

podem ocorrer, e as características do tecido e o comprimento da onda da luz são fatores determinantes para resultar em uma maior ou menor importância de cada um dos tipos de interação, a interação luz-tecido pode ser empregada tanto para tratamento quanto para diagnóstico (ANDRADE, 2016).

Em 1956, foi criado o banco de tecido da Unidade de Queimaduras do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, não existia normatização específica. O Instituto Central do Hospital das Clínicas (ICHC) em convênio com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/SP), e financiado pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), implantou em 2000 o primeiro banco de tecidos no Brasil, a utilizar radioesterilização em tecidos conservados em glicerol concentrado (mínimo 85%), para transplantes alógenos, proporcionando a viabilização de estudos e avaliação dos tecidos submetidos a esse processo (BOURROUL, 2004).

Alterações morfológicas e funcionais no tecido podem ser observadas devido à absorção da energia ionizante liberada durante a radiação. Apesar do processamento, a preservação e o armazenamento de aloenxertos de tecidos serem sempre realizados em condições assépticas restritas, é possível indicar a presença de microrganismos contaminantes, necessitando de uma esterilização terminal ou secundária por irradiação gama. No entanto, evidências substanciais e crescentes demonstram que a esterilização por radiação ionizante pode gerar alterações nas características morfológicas e funcionais dos enxertos ósseos, tendinosos, traqueais e de pele. A esterilização também reduz o potencial terapêutico dos enxertos de pele, apresentando alterações estruturais na membrana basal, fibras elásticas e colágenas que foram observadas em enxertos de pele irradiados, enquanto as fibras elásticas finas tornavam-se menos resistentes. Portanto a radioesterilização para descontaminação da pele pode gerar alterações morfuncionais, além de acarretar danos ao profissional habilitado, como também o alto custo empregado nessa técnica. Diferentemente a inativação fotodinâmica mostra evidências de ser viável operacional, tem baixo custo e com danos mínimos à saúde do profissional que está operando (HARRELL *et al.*, 2018).

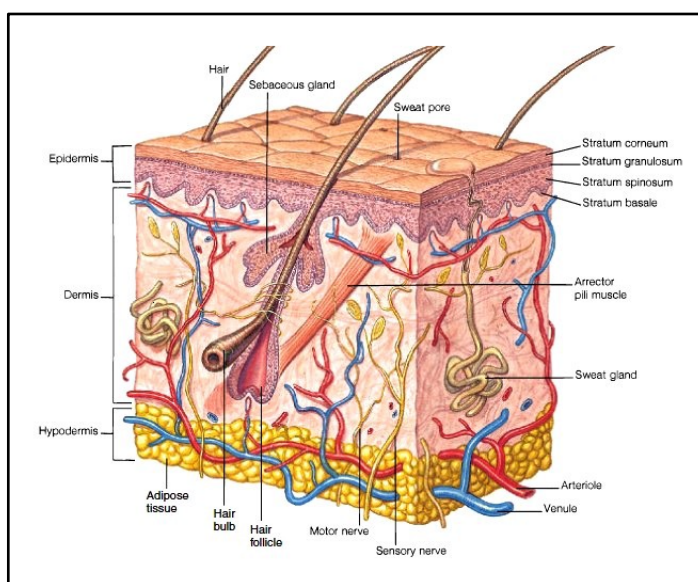
Então levantamos a questão, a utilização da inativação fotodinâmica pode ser uma alternativa em banco de tecidos para descontaminação de pele?

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histologia da pele

A pele é o maior órgão do nosso corpo, é de suma importância para a proteção de barreiras e defesa de primeira linha contra trauma, infiltração microbiana e radiação. Outras funções principais da pele incluem isolamento; regulação da temperatura; mediadores de toque, calor e frio e síntese de vitamina D quando a pele é exposta à luz solar. A pele consiste em três grandes camadas distintas; epiderme, derme e camada subcutânea de gordura, conforme ilustrado na (figura 1). O objetivo da camada de gordura subcutânea é o isolamento térmico, a derme é predominantemente composta por colágenos, elastina e fibrilina, além de terminações nervosas, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, folículos capilares e principais vasos sanguíneos que fornecem nutrientes para a camada epidérmica. A epiderme é a camada mais superficial da pele e compreende a barreira da pele, apesar de ser a mais fina das três camadas, é sem dúvida a mais complexa (BLISS *et al.*, 2016; CUNDELL, 2018).

**Figura 1 - A pele e seus anexos.**



Fonte: MEZA (2018).

A pele atua como uma barreira a insetos ou alérgenos ambientais. A pele pode ser subdividida em várias camadas com especialização funcional, o estrato córneo, mais externo, o estrato granuloso subjacente e o estrato espinhoso e estrato inferior basal (GONZALEZ *et al.*, 2017).

## 2.2 Microbiologia da pele

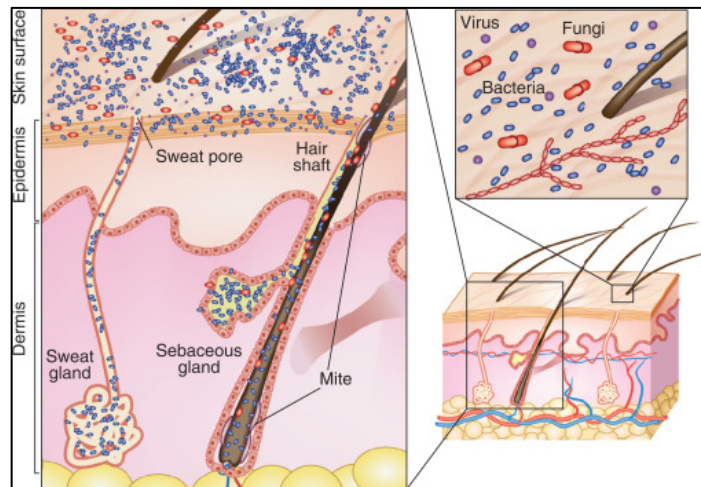
A pele humana é coberta com uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Os microrganismos que vivem na superfície da pele desempenham um papel na manutenção da saúde humana, pela produção de peptídeos antibacterianos, formação de biofilmes e inibição da invasão por patógenos. Porém muitos desses microrganismos também pode causar ou exacerbar doenças na pele (TAKEMOTO *et al.*, 2015).

O adulto tem uma média de superfície de pele de 1,5 a 2,0 m<sup>2</sup>, sendo entre 2 e 3 mm de espessura. A função clínica da microbiota da pele humana é ocupar vários habitats, bloquear a colonização da pele por microrganismos oportunistas ou patogênicos. A pele fornece uma diversidade de habitats para bactérias, leveduras e fungos com microbiota diferente associada às principais regiões da pele: axila úmida, períneo e regiões entre os dedos dos pés, pescoço e tronco, glândulas sebáceas e antebraços secos e pernas (CUNDELL, 2018).

As contagens microbianas normais usando métodos de cultura geralmente variam de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> microrganismos por centímetro quadrado com contagens atingindo uma alta de 10<sup>6</sup> por centímetro quadrado nas áreas úmidas como virilha e axila, lavando o corpo com água e sabão reduz temporariamente o risco microbiano por ordem de grandeza. Com base nos métodos tradicionais de cultura, as bactérias predominantes são *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus spp.* em locais oleosos, *Corynebacterium spp* e *Staphylococcus spp.* em locais úmidos, e uma significativa presença de membros dos filos beta-Proteobacteria e Flavobactérias nos locais secos (CUNDELL, 2018).

Os habitats distintos são caracterizados por diferenças na espessura da pele, dobras, densidades dos folículos e glândulas capilares, invaginações e apêndices cutâneos, incluindo glândulas sudoríparas (écrinas e apócrinas), glândulas sebáceas e folículos capilares, provavelmente estão associados à sua própria microbiota. A ilustração da (figura 2), mostra os microrganismos (vírus, bactérias, fungos e ácaros) que cobrem a superfície da pele e residem profundamente nos cabelos e nas glândulas (KONG; SEGRE, 2012).

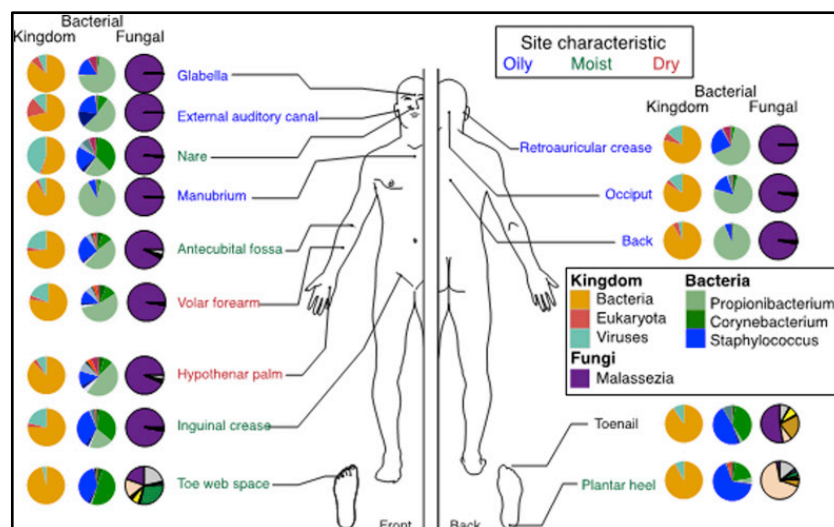
**Figura 2 -** Microrganismos presentes na pele.



Fonte: KONG; SEGRE (2012).

O desenvolvimento de técnicas moleculares para identificar e quantificar organismos microbianos revolucionou nossa visão do mundo microbiano e deu início a “corrida do ouro” no estudo de micróbios da pele. Estudos mostram que a proporção de filos bacterianos depende da fisiologia do local da pele e com bactérias e fungos específicas associadas a microambientes úmidos, secos e sebáceos. Segue a ilustração da (figura 3) mostrando a classificação a nível de família das bactérias e fungos que colonizam o indivíduo em diferentes locais da pele (KONG; SEGRE, 2012, 2017).

**Figura 3 -** Distribuição topográfica de reinos microbianos, bactérias e fungos em diferentes locais da pele do corpo humano.



Fonte: KONG; SEGRE (2017).

Recentemente, a microbiologia da pele era limitada a estudos dependentes da cultura, com a maioria das amostras de patologias. No entanto, as bactérias não-patológicas são detectados em todos os lugares em seres humanos, com até  $1 \times 10^7$  bactérias por  $\text{cm}^2$  sobre a pele. Embora a abordagem baseada na cultura ainda seja comum, muitos microrganismos são difíceis de cultivar e, portanto são sub-representados ou não são detectados em pesquisas baseadas em cultivo de cultura (EDMONDS-WILSON *et al.*, 2015).

### **2.3 Doadores de órgãos e tecidos humanos**

O transplante é definido como a transferência (enxerto) de células, tecidos ou órgãos humanos de um doador para o destinatário, com o objetivo de restaurar as funções no corpo, é uma terapia totalmente aceitável, limitada principalmente pela escassez de órgãos disponíveis para a sua realização. A questão da doação de órgãos é complexa e multifatorial, envolvendo fatores éticos, legais, médicos, organizacionais e sociais. Países em todo o mundo relataram que as atitudes das pessoas em relação à doação de órgãos são influenciadas por fatores como conhecimento, educação e religião (CHAKRADHAR *et al.*, 2016; RÍOS *et al.*, 2015).

A doação de órgãos para transplante é um processo complexo, que envolve um conjunto de procedimentos administrados pelo Sistema Nacional de Transplantes (SNT). O processo de doação para transplante envolve um protocolo a ser seguido em todo o território nacional: identificação de pacientes com os critérios clínicos de morte encefálica (ME); diagnóstico de ME; avaliação clínica e laboratorial; manutenção do potencial doador; e entrevista familiar. Devido a essa complexidade, é necessário o desempenho da equipe interdisciplinar envolvendo equipes de médicos, enfermagem, assistência social e técnicos de laboratório (FERNANDES; BITTENCOURT; BOIN, 2015).

Na crença católica, São Cosme e São Damião são considerados os padroeiros dos transplantes. O primeiro transplante foi feito por esses Santos na Sicília, no século III. Um cristão teve uma perna amputada por gangrena e o único cadáver disponível era o de um etíope, sendo realizado o transplante do membro dele com êxito, apesar das pernas de cores diferentes. Comprovadamente a história do transplante de órgãos iniciou-se na década de 1940, em algumas cidades como Londres, Paris, Edimburgo e Boston. No Brasil, o primeiro transplante aconteceu duas décadas mais tarde, em

1960, quando foram realizados transplantes de rim e de coração. Esses procedimentos se espalharam por várias partes do mundo em função do avanço das técnicas cirúrgicas de transplantes (GARCIA *et al.*, 2015; REZENDE *et al.*, 2015).

No Brasil, os primeiros transplantes foram realizados no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP) em 1968. O primeiro transplante de rim no Brasil foi realizado em 1964, seguido de coração, fígado e pâncreas em 1968, e transplante de pulmão em 1989. A primeira lei que regula a recuperação e transplante de órgãos foi aprovada em 1963. A última legislação ocorreu em 1998, na qual o SNT foi criado para coordenar todas as atividades de doação e transplante de órgãos de maneira descentralizada e regulamentada no nível estadual (PACHECO, 2016; GARCIA *et al.*, 2015).

#### **2.4 Doador de pele e Banco de tecidos**

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica a doação de pele pode ser realizada a partir de indivíduos com o diagnóstico de morte encefálica ou parada cardiorrespiratória. A família do doador é entrevistada quanto ao desejo de doar, assinando um termo de consentimento, e posteriormente é investigada a existência de doenças transmissíveis com o objetivo de evitar a infecção do futuro receptor. A captação de pele do doador, consiste em retirar, com o auxílio de um dermatomo, finas lâminas com espessuras que variam de 0,8 a 1,0 mm, não gera sangramento nem tampouco mutilação destas áreas, apenas a mudança para uma coloração mais clara (figura 4) (CHEM *et al.*, 2016).

**Figura 4** - Doador de pele humana: aspecto da região doadora após a retirada.



Fonte: CHEM *et al.* (2016).

Logo após a retirada, a pele é encaminhada ao Banco de Tecidos, iniciando-se o processamento e sua conservação em glicerol. Durante este processo, são realizados diversos testes microbiológicos, ficando a pele liberada para envio somente após a garantia de ausência total de microrganismos (CHEM *et al.*, 2016).

Os estudos Luyet e Webster documentaram o congelamento, como um método eficaz para a preservação temporária dos tecidos. Estudos relataram os primeiros procedimentos de armazenamento de pele de cadáveres, utilizando soluções suplementadas com 10% de soro como conservante. Todas essas etapas levaram à criação de um novo tipo de estabelecimento a partir do final dos anos 80, equipado para armazenar a pele e outros tecidos, essas instalações foram conhecidas posteriormente por seu nome genérico como "bancos de pele" (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2016).

Em 1949, o primeiro banco de pele foi estabelecido pela Marinha dos Estados Unidos da América (EUA). Desde então, vários outros bancos de pele foram fundados, principalmente nos EUA e na Europa, e muitas vezes organizados como bancos de vários tecidos. Em 2005, havia aproximadamente 54 bancos ativos na América do Norte. Atualmente, existem quatro bancos de pele no Brasil, com sede em São Paulo, Porto Alegre, Recife e Curitiba (MATIOSKI *et al.*, 2015).

Os bancos de tecidos são especializados no processamento e na conservação de enxertos de tecidos, tais como pele, osso, cartilagem, tendão, córneas, valvas, doados para transplantes alógenos (a parte é doada por outra

pessoa), fornecendo tecidos de alta qualidade técnica e segura para transplante (BRASIL, 2017).

Atualmente, existem cerca de três diferentes técnicas de preservação usadas no banco de pele, ou seja, preservação de glicerol, congelamento profundo e criopreservação. Portanto, os bancos de pele usam um desses métodos de acordo com a adequação da região (KESWANI *et al.*, 2018).

O uso de aloenxertos humanos está intimamente relacionado ao desenvolvimento de diferentes métodos para a preservação de tecidos. Essas estratégias são projetadas para integrar procedimentos de recuperação de tecidos que buscam: manutenção da viabilidade celular; preservação das proteínas; presença de fatores de crescimento e a completa integridade dos tecidos. Todos esses fatores se concentram na geração de produtos biológicos de alta qualidade, com alta segurança à saúde e de extremo valor terapêutico (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2016).

Segundo a RDC nº 55, legislação vigente que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana, o Banco de Pele deve implementar ações de controle de qualidade com o objetivo de contribuir para que os tecidos sejam liberados e disponibilizados depois que todos os parâmetros relacionados com a segurança e a qualidade do produto, ao longo de todos os processos realizados tenham sido alcançados e julgados como satisfatórios. O método utilizado para a realização do controle de qualidade não deve comprometer a integridade do tecido, na qual só podem ser liberados e disponibilizados para uso terapêutico depois de observados os seguintes requisitos: I – avaliação macroscópica; II – avaliação biomicroscópica, somente no caso dos tecidos oculares; III – testes microbiológicos nos tecidos, com exceção dos tecidos oculares; e IV – exame de imagem, somente no caso dos segmentos osteoarticulares, ossos longos e cabeças femorais (BRASIL, 2015).

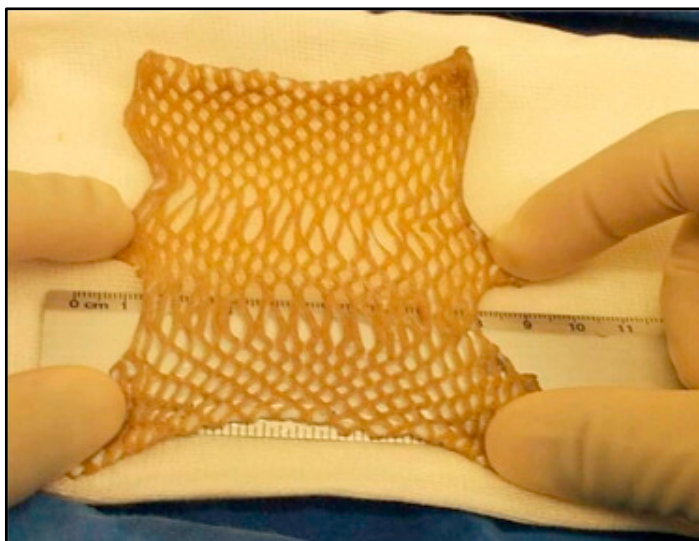
A recuperação biológica é o padrão-ouro nos processos de preservação de tecidos em bancos de tecidos. O controle de qualidade, a certificação sanitária e a estabilidade biológica dos aloenxertos para transporte têm um impacto direto no resultado terapêutico de um implante de tecido (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2015)

## 2.5 Métodos atuais de descontaminação microbiana da pele

Atualmente é utilizada a radioesterilização para garantir a qualidade dos tecidos usados em transplantes e outras aplicações clínicas, como curativos em queimaduras e feridas na pele. Na maioria dos tecidos biológicos é utilizado radiação ionizante para minimizar a possibilidade de rejeição do organismo, matar bactérias e reduzir o risco de transferir doenças contagiosas como HIV, hepatite C ou citomegalovírus (BRASIL NUCLEAR, 2017).

Cada método (descontaminação química, liofilização, esterilização gama) tem um efeito diferente nas características biológicas, físicas e químicas do tecido (índice de viabilidade celular, perda de água, elasticidade e resistência) e, finalmente, em seu uso subsequente (figura 5) (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2016).

**Figura 5** - Pele humana em malha recuperada para uso em transplantes.



Fonte: MARTÍNEZ-FLORES *et al.* (2016).

O processamento de descontaminação nos bancos de tecidos é realizado por uma incubação de antibióticos, que por si só não são suficientes para garantir a viabilidade do tecido, conseqüentemente utilizando a esterilização por métodos físicos ou químicos. Para esterilização química são utilizados principalmente, etileno óxido, propileno glicol e ácido peracético. O uso de substâncias químicas pode levar a persistência de resíduos tóxicos nos tecidos. É mais adequado usar a esterilização por irradiação, que também pode reduzir a antigenicidade dos tecidos, não causa aumento da temperatura do tecido, não deixa resíduos perigosos, mas pode causar efeitos biológicos e mudanças mecânicas. Feixe de elétrons, gama e raios-X podem

ser usados, mas os raios gama são os preferidos devido à sua excelente penetração nos tecidos. As fontes mais comuns de raios gama são cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ) ou cério ( $^{137}\text{Cs}$ ) e internacionalmente a dose recomendada para esterilização de enxertos de tecidos é de 25 kilogray (kGy). É possível usar também irradiação por feixe de elétrons para esterilização, mas devido à menor penetração, é limitado pela espessura da amostra esterilizada (MRÁZOVÁ *et al.*, 2016).

A irradiação por 25 kGy é suficiente para a desinfecção de aloenxertos de pele, uma redução logarítmica de até 5,2 vezes (desinfecção completa) na carga biológica após uma exposição de até 33,4 kGy. A redução da carga biológica fornece a maior riqueza de informações sobre a eficácia do tratamento antimicrobiano (JOHNSTON *et al.*, 2016).

## 2.6 Terapia Fotodinâmica

A TFD, é conhecida na língua inglesa como Photodynamic therapy (PDT), é uma técnica moderna de tratamento minimamente invasiva que demonstrou eficiência para uma ampla gama de aplicações clínicas. Atualmente, a TFD é ativamente empregada no tratamento antitumoral e está envolvida em ações antimicrobianas e anti-inflamatórias devido à alta resistência dessas patologias ao tratamento medicamentoso. Recentemente, a TFD foi introduzida como uma técnica para o tratamento de pele em medicina estética (SHAKHOVA *et al.*, 2018).

A inativação fotodinâmica antimicrobiana (IFDa) ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) combina com um agente fotossensível, denominado fotossensibilizador. O comprimento de onda específico da luz induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (N), capazes de matar as células. No entanto, com o rápido surgimento de resistência a antibióticos, TFDa tem sido utilizada como um método alternativo para erradicar microrganismos patogênicos, como bactérias e fungos (BALTAZAR *et al.*, 2015; AHMED *et al.*, 2018).

No entanto, o termo TFD foi cunhado em 1900 por Tappeiner e seus colegas de trabalho na Alemanha. O primeiro relatório detalhado da observação de que a combinação de luz e corante poderia ser prejudicial para uma célula foi publicado por Raab em 1900, um estudante de Tappeiner. Raab observou que o protozoário *Paramecium caudatum* morreu após exposição à luz na presença de um corante acridina. Após essa descoberta, em 1903, Tappeiner e o dermatologista Jesionek

traduziram suas descobertas do banco para a beira do leito em um relatório que detalhava como a aplicação tópica de eosina associada à exposição à luz branca tratava efetivamente um tumor de pele. Significativamente, Tappeiner e seu colega Jodlbauer também observaram que o efeito fototóxico não ocorreu na ausência de oxigênio e introduziram o termo "ação fotodinâmica" em 1907 para descrever essa reação (BALTAZAR *et al.*, 2015).

As vantagens da IFDa como potencial terapia antimicrobiana clínica foram reforçadas quando se percebeu que funciona igualmente bem, independentemente do status de resistência a antibióticos das células microbianas e, além disso, até agora a IFDa não demonstrou selecionar cepas resistentes. Outra vantagem da IFDa é que o FS é aplicado topicamente na área infectada, demonstrando matar células cultivadas com biofilme *in vitro* e *in vivo*. A morte de células microbianas é rápida (segundos), enquanto a ação dos antibióticos pode levar horas ou dias, dando uma vantagem potencial contra infecções de rápida disseminação. Embora muitas infecções possam ocorrer no interior do corpo, agora é possível fornecer o FS e luz a quase todas as regiões anatômicas, por meio de endoscópios, agulhas e fibras ópticas inseridas intersticialmente de diâmetro estreito (HAMBLIN, 2017).

A terapia fotodinâmica anticâncer é agora uma realidade clínica em hospitais e clínicas de dermatologia em todo o mundo, inclusive para o tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular há mais de 25 anos, mas a terapia fotodinâmica antimicrobiana ainda não é amplamente apreciada pelos clínicos e órgãos responsáveis pela prestação de cuidados de saúde (WAINWRIGHT *et al.*, 2017).

## **2.7 Mecanismo de ação da TFD**

TFD é uma abordagem multifatorial que envolve três componentes principais, fotossensibilizador, luz e oxigênio. Inclui duas etapas do processo, o primeiro passo é à administração de um fotossensibilizador e o segundo passo é a ativação a um comprimento de onda apropriado, fazendo com que produzam espécies reativas de oxigênio e destruam as células anormais (HEIDARI, 2016; SHAKHOVA *et al.*, 2018).

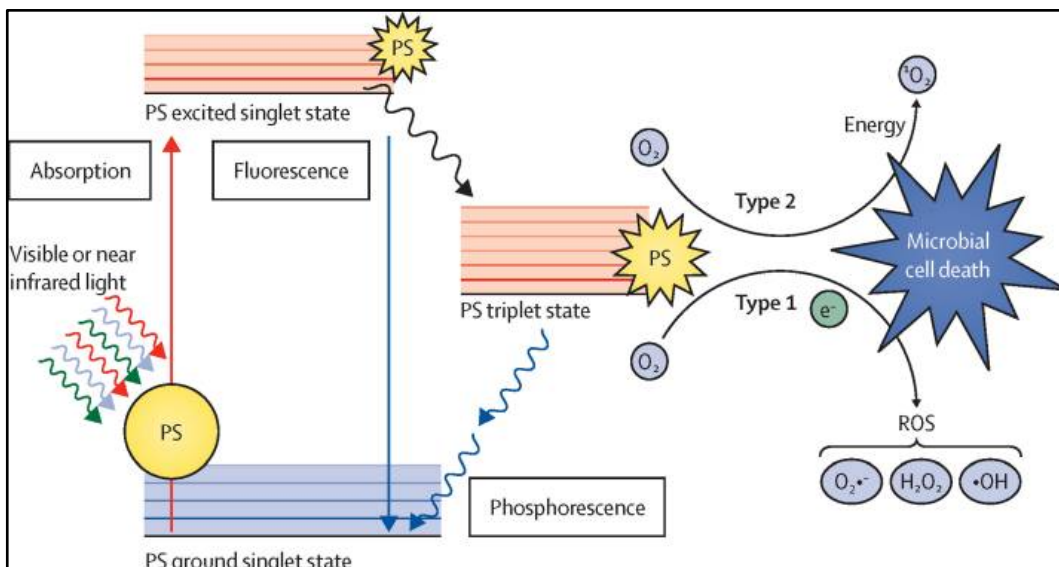
O princípio básico do conceito de terapia fotodinâmica antimicrobiana é a combinação de luz visível ou infravermelho próximo, oxigênio e um fotossensibilizador capaz de absorver e transferir energia ou elétrons após a absorção da luz para o oxigênio molecular para a geração de espécies reativas de oxigênio (Figura. 6), como

oxigênio singlete, ânions superóxido e radicais hidroxila, têm um amplo espectro de atividade e podem destruir vários alvos microbianos moleculares (por exemplo, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) (WAINWRIGHT *et al.*, 2017).

A geração de ERO pode seguir duas vias alternativas após a ativação da luz por um determinado fotossensibilizador. O FS no estado fundamental, pode absorver um fóton, levando-o ao estado singlete excitado, este estado pode sofrer cruzamento intersistema para um estado de tripleto de vida mais longa que pode interagir com o oxigênio de dois mecanismos: em tipo 1, a geração de  $O_2$ ,  $OH$ , e  $H_2O_2$  por transferência de elétrons do FS; no tipo 2, o estado tripleto do FS pode sofrer diretamente troca de energia com oxigênio no estado fundamental tripleto, levando à formação de  $O_2$  excitado (WAINWRIGHT *et al.*, 2017).

As ERO geradas reagem rapidamente com seu ambiente, dependendo da localização do FS excitado, por exemplo em paredes celulares de microrganismos, membranas lipídicas, peptídeos e ácidos nucleicos. O FS retorna ao seu estado inicial após esse ciclo, pronto para absorver um novo fóton e gerar ERO adicionais,  $O_2^{\cdot -}$  = ânions superóxido,  $OH$  = radical hidroxila,  $H_2O_2$  = peróxido de hidrogênio,  $O_2$  = oxigênio singlete,  $e^-$  = elétron (WAINWRIGHT *et al.*, 2017).

**Figura 6** - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana.



Fonte: Diagrama de Jablonski - Adaptado por WAINWRIGHT *et al.* (2016).

## 2.8 Fontes de Luz

Várias fontes de luzes diferentes podem ser utilizadas na IFDa, incluindo fontes de luz de ondas contínuas de amplo espectro ou lâmpadas (luz branca, azul, vermelha ou verde), lasers, fontes de luz intensa pulsada (LIP), lâmpadas de arco de xenônio filtradas, lâmpadas de iodetos metálicos ou fluorescentes e mais recentemente, lâmpadas de diodos emissores (LED) (WEN; LI; HAMBLIN, 2017).

Para a ativação da luz de um FS, três fontes de luz principais foram descritas na literatura até o momento: lasers, LEDs e lâmpadas de descarga de gás (por exemplo, lâmpadas de descarga de quartzo-tungstênio-halogênio ou descarga de xenônio). Os LEDs podem ser facilmente acoplados em uma única fibra óptica e montados em diferentes dispositivos de distribuição de luz, comparados aos lasers, oferecem um espectro de emissão um pouco maior e seus custos são mais baixos. Ao contrário de lasers e LEDs, as lâmpadas halógenas têm a vantagem de poderem ser filtradas espectralmente para corresponder a qualquer FS, no entanto, eles não podem ser acoplados com eficiência em feixes de fibra óptica ou guias de luz líquida e causam mais aquecimento em comparação com lasers e LEDs (CIEPLIK *et al.*, 2018).

A entrega eficaz da luz de tratamento ao tecido alvo requer uma correspondência adequada da fonte de luz com o tecido, o sensibilizador e o dispositivo de entrega. Lasers, LEDs e lâmpadas são três principais categorias convencionais de fontes de luz usadas para aplicações da IFDa. A localização do tumor, o fotossensibilizador e a dose óptica são fatores determinantes para a escolha da fonte de luz para a TFD (FINLAY; DARAFSHEH, 2016).

Os LEDs têm uma vantagem sobre os lasers tradicionais, nos quais consomem menos, facilitando assim o uso de baterias para energizá-las, o que as torna extremamente portátil. Dissipam menos calor, minimizando a perda de energia e podem ser organizados para se adequar à área ou órgão de interesse que precisa ser irradiado. Devido aos avanços no campo da tecnologia de semicondutores, os LEDs têm durabilidade notável e são de baixo custo. Além disso, ao contrário dos lasers, eles emitem luz sobre uma área de superfície maior com dissipação homogênea de energia, permitindo o tratamento de lesões e tumores maiores em menos sessões (DUSE *et al.*, 2018).

A eficácia clínica da IFDa depende da densidade de energia da luz. Existem várias fontes de luz usadas para a TFD, como luz ultravioleta (330-400 nm), luz vermelha (600-700 nm) e luz infravermelha (700-1000) (BASKARAN; LEE; YANG, 2018).

## 2.9 Agentes Fotossensibilizantes

Um bom FS deve absorver fótons com eficiência, o estado tripleto deve durar um tempo para reagir com as moléculas alvo vizinhas. A maioria dos compostos que forma os estados tripletos capazes de produzir radicais e ERO possuem estruturas em anel tricíclicas, heterocíclicas ou semelhantes a porfirinas com bandas duplas conjugadas. Pequenas mudanças na estrutura molecular influenciam a propriedade fotossensibilizante de um composto (HEIDARI, 2016).

A escolha do FS é fundamental para o sucesso do tratamento da IFDa. O fotossensibilizador deve ser preferencialmente excitado pela luz de um comprimento de onda na janela terapêutica (600-700 nm), que possui maior capacidade de penetração no tecido, deve ser não tóxico para as células no escuro (ou seja, não deve causar morte celular na ausência de luz). Além disso, deve ser capturado ou retido seletivamente pelas células alvo (CALIXTO *et al.*, 2016).

O design molecular ideal de um FS antimicrobiano deve ter várias características particulares. Antes de tudo, não deve ser tóxico no escuro, principalmente em células de mamíferos. Ter bons rendimentos quânticos de ERO e um alto coeficiente de absorção molar no comprimento de onda em que a penetração da luz no tecido é boa. Deve mostrar seletividade para as células microbianas em relação às células dos mamíferos hospedeiros. Os FS antimicrobianos mais amplamente utilizados são, sem dúvida, os corantes fenotiazínicos, azul de metileno (AM) e azul de toluidina, ambos os compostos receberam aprovação regulatória em vários países do mundo (HAMBLIN, 2017).

### 2.10 Azul de Metileno

O AM é um corante orgânico com propriedades fluorescentes e fotossensibilizantes. Esse FS efetivamente inativa vírus e bactérias e mata células malignas. A carga positiva e seu baixo peso molecular promovem uma interação

aprimorada, isso o torna uma opção adequada para TFD de infecções e câncer. É mais comumente utilizado como um FS na TFD antimicrobiana, para o tratamento de infecções por *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (CALIXTO *et al.*, 2016).

O primeiro corante fenotiazínio (azul de metileno) foi desenvolvido por Heinrich Caro na década de 1870. Esses corantes são compostos por um sistema de três anéis com grupos laterais auxocrômicos, carregam uma única carga positiva e exibem um rendimento quântico de oxigênio singlete abaixo de (0,5) agindo, portanto, principalmente de acordo com o mecanismo do tipo I. Mostram forte absorção no espectro vermelho (600–680 nm), o que é vantajoso para a sua aplicação como FS devido à melhor penetração da luz no tecido a partir de comprimentos de onda mais longos (SEONG; KIM, 2015; CIEPLIK *et al.*, 2018).

## 2.11 Modelo Animal

O porco doméstico (*Sus scrofa domesticus*) é uma espécie mundial de animal doméstico, são animais recomendados pela literatura como alternativa para modelo de pele humana. A pele de porco é anatomicamente, fisiologicamente, bioquimicamente e imunologicamente semelhante à pele humana, é "pele fixa" como seres humanos e diferente de roedores ou coelhos. A pele de porco espelha a pele humana ao ter um pelo escasso, uma epiderme relativamente espessa, cinética de renovação epidérmica semelhante, composição lipídica e bioquímica de carboidratos, propriedades biofísicas lipídicas e um arranjo semelhante de colágeno dérmico e fibras elásticas (LIU, 2019; PABST, 2020).

O suíno está se tornando cada vez mais importante como modelo biomédico, dadas as semelhanças entre porcos e seres humanos, uma maior compreensão da biologia subjacente da saúde e doenças humanas pode vir do porco. O porco tem muitas vantagens sobre outras espécies como modelo biomédico e acredita-se ser o modelo ideal para xenotransplante, avaliação de risco de contaminantes ambientais e descoberta de medicamentos. Em muitos aspectos, o porco é mais semelhante ao humano do que outros modelos em termos de anatomia, fisiologia e fisiopatologia; filogeneticamente, os porcos estão três vezes mais próximos dos seres humanos no nível dos nucleotídeos do que os ratos (WALTERS *et al.*, 2017).

### **3 HIPÓTESE**

O presente estudo visa investigar a hipótese de que a inativação fotodinâmica, ou seja, baixa dose de azul de metileno, como um agente fotossensível, associado ao LED de baixa potência pode favorecer na descontaminação de fragmentos de pele de suínos, e desta forma pode ser utilizada para transplantes de pele.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da inativação fotodinâmica na pele suína, visando o seu uso para utilização de descontaminação da pele destinadas a transplantes.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Analisar a eficácia de diferentes concentrações de azul de metileno utilizadas para descontaminação de pele suína;
- Avaliar a relação da Unidade formadora de colônia (UFC) presente no tecido após o uso da TFD;
- Avaliar por meio da Tomografia de coerência óptica (OCT), a utilização da Terapia Fotodinâmica em possíveis alterações morfológicas na pele em suas diferentes camadas;
- Estabelecer procedimento operacional padrão para utilização da inativação fotodinâmica na descontaminação de pele animal.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Protocolo Experimental no modelo de pele de suínos**

O experimento foi realizado no laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CLA-IPEN/SP), localizado na Universidade de São Paulo, sob supervisão da Dra. Martha Simões Ribeiro, seguindo todas as normas e procedimentos de biossegurança.

### **5.2 Aspectos éticos**

O presente estudo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba/ São José dos Campos sob o número de protocolo A05/CEUA2019, conforme (ANEXO A), seguindo os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Esta pesquisa foi realizada em duas etapas. A primeira etapa foi realizada os testes com a TDF utilizando o FS azul de metileno com uma concentração de 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  (micromolar), a segunda etapa com o azul de metileno na concentração de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ , ambos os testes seguiram o mesmo protocolo e metodologia, a única diferença foi a concentração de azul de metileno utilizada.

### **5.3 Amostras**

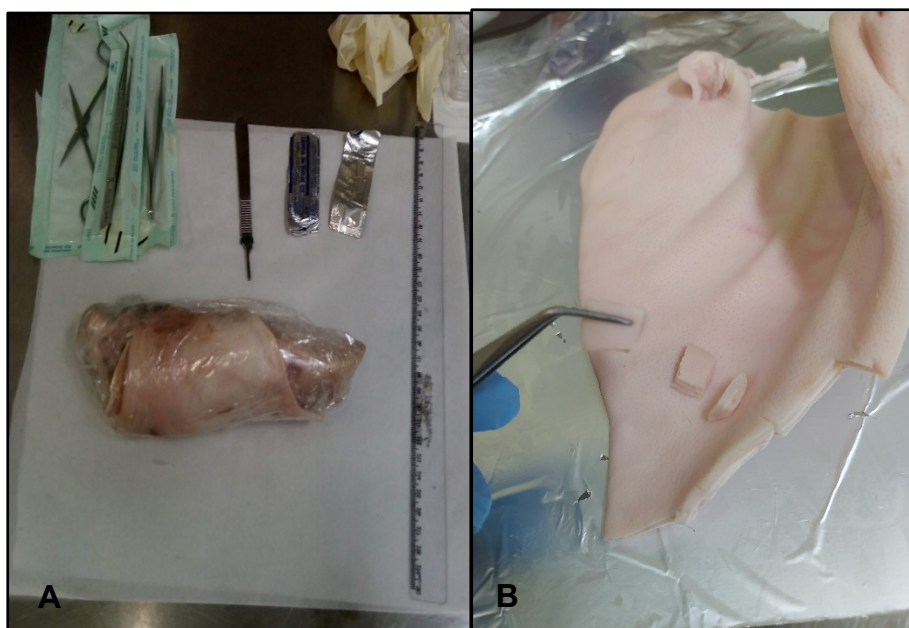
Foram utilizados fragmentos de pele suína, mas conhecido como porco, com dimensões de tamanho 1x1 cm, provenientes da região da orelha, optou-se por utilizar a orelha devido ter menos camada gordurosa na pele, por ser composta de cartilagem como também a localização da região da orelha facilita a realização dos recortes de pele. A orelha do suíno foi comprada em um estabelecimento especializado em vendas de suínos no Mercado Municipal de São Paulo. Este estudo foi composto no total de 47 recortes de pele da orelha do suíno. Divididos os recortes de pele em três grupos principais: Grupo Teste (22 recortes); Grupo no Escuro (18 recortes) e Grupo Controle (7 recortes). O quadro 1 demonstra as características e requisitos para utilização das amostras de pele no estudo:

**Quadro 1** - Características da orelha do suíno.

<b>Características das amostras</b>
Orelha retirada do porco no mesmo dia do abate
Orelha fresca (sem adição de sal)
Orelha sem filamento/pelo
Acondicionamento e transporte correto para o laboratório

Fonte: A autora (2020).

O transporte da orelha até o laboratório do CLA/IPEN era acondicionado em caixas térmicas. Foram retirados os pelos da pele para posteriormente realizar os recortes, assepticamente era recortados os fragmentos de pele, utilizando instrumentos esterilizados, com um bisturi nº 3 da marca (golgran) e lâmina nº 12 da marca (surgical blades), com o auxílio de uma tesoura spencer 12 cm, pinça de instrumental clínica de 15 cm e uma régua comum de 30 cm. Os recortes eram feitos com luvas de látex, com os materiais estéreis e realizado na bancada do laboratório previamente higienizada com álcool 70%, com o objetivo de evitar mais ainda a contaminação da pele.

**Figura 7** - Recorte dos fragmentos de pele.

Legenda: A= Materiais utilizadas para o recorte da pele; B= Fragmentos de pele após ser recortados.  
Fonte: A autora (2020).

Após os recortes de pele, pesava-se individualmente na balança eletrônica analítica, em seguida mantidos em recipiente estéril, em tubos falcon ou microtubo tipo eppendorf, emergidos em solução salina estéril 0,9% para evitar a desidratação (CONCEIÇÃO *et al.*, 2017), e seguidamente acondicionadas na geladeira para no outro dia dar sequência no experimento.

**Figura 8** - Acondicionamento dos recortes de pele.



Fonte: A autora (2020).

#### 5.4 Preparo das soluções

O experimento ocorreu em duas etapas, em virtude dos resultados e o tempo para elaboração do experimento, a primeira etapa foi utilizada as concentrações de 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  e na segunda etapa as concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ . Diluiu-se o azul de metileno a partir de uma solução de 10 mM (milimolar) e utilizou-se água destilada estéril na dissolução. Foram utilizadas 2 placas de cultivo de células de 24 poços para cada etapa, uma para o grupo no escuro e outra para o grupo TFD, sendo necessário 1,5 mL de solução para cobrir a pele que se encontrava em cada poço da placa, na concentração de 50,75 e 100  $\mu\text{M}$  foram colocados 16 fragmentos de pele em cada placa e na concentração 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  foi necessário 9 fragmentos de pele na placa do grupo escuro e na placa do grupo da TFD 6 fragmentos. No grupo controle e luz utilizou-se água destilada estéril para cobrir os fragmentos de pele, sendo na

primeira etapa um total 36 mL para azul de metileno e 12 mL para água destilada e na segunda etapa 18 mL de solução de azul de metileno e 9 mL de água destilada.

Partindo da solução inicial de 10 mM de azul de metileno, convertendo para micromolar, permanece 10.000  $\mu\text{M}$ , foi preparado uma nova diluição em uma concentração usual de 50,75 e 100  $\mu\text{M}$ ; 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ . Aplicou-se cinco cálculos na respectiva fórmula para cada concentração de AM, sendo o  $V_2$  na primeira etapa do experimento correspondente a 18 mL de azul de metileno e na segunda etapa 9 mL, a quantidade de mL do AM corresponde ao número de poços utilizados na placa, multiplica-se com (1,5 mL) que é a quantidade que cada poço da placa suporta, antes de aplicar na equação transforma-se o volume encontrado em mL para  $\mu\text{L}$ . Para o preparo desta diluição, utilizamos a seguinte equação:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Onde:

$C_1$  = Concentração de 10 mM de azul de metileno

$V_1$  = volume a ser encontrado da concentração de 50,75 e 100; 12,5 e 25  $\mu\text{M}$

$C_2$  = Concentração de 50,75 e 100; 12,5 e 25  $\mu\text{M}$

$V_2$  = volume da diluição correspondente, no caso sendo 18 mL/18.000  $\mu\text{L}$  e 9mL/9.000  $\mu\text{L}$ .

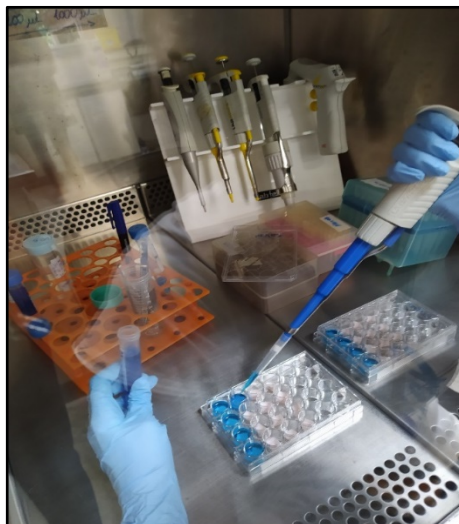
Após esse cálculo encontramos o resultado do  $V_1$  de azul de metileno de 50,75 e 100; 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ , e posteriormente subtraímos com o volume da diluição correspondente, para encontrar o volume de água destilada para diluir cada concentração respectiva de azul de metileno. Segue abaixo o exemplo.

$$\text{VAD: } V_1 - V_2$$

Após encontrar cada volume de AM e água destilada, homogeneizar-se os dois volumes em um tubo falcon de 15 mL, realizando assim a diluição nas respectivas concentrações de azul de metileno. Com o auxílio de uma pinça na câmara de fluxo realiza-se a disposição das amostras, colocou-se um recorte de pele em cada poço

da placa e posteriormente com o auxílio de pipeta coloca-se 1,5 mL de cada concentração de azul de metileno.

**Figura 9** - Preparação das amostras para irradiação.



Legenda: Distribuição de 1,5 ml de azul de metileno em cada poço da placa  
Fonte: A autora (2020).

## 5.5 Divisão dos Grupos

Os grupos foram divididos em duas etapas do experimento, conforme esquematizado abaixo.

### Primeira etapa:

Grupo Controle (G1): Não recebem tratamento e foram apenas submetidos a ficar no escuro, com solução presente de água destilada

Grupo Azul de metileno de 50  $\mu$ M (G2): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, mas submetidos a ficar no escuro.

Grupo Azul de metileno de 75  $\mu$ M (G3): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, mas submetidos a ficar no escuro.

Grupo Azul de metileno de 100  $\mu$ M (G4): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, mas submetidos a ficar no escuro.

Grupo Luz (G5): Recebem apenas o tratamento de Ledterapia, com solução presente de água destilada.

Grupo TFD com 50  $\mu\text{M}$  de azul de metileno(G6): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, submetidos a ficar em contato com a luz.

Grupo TFD com 75  $\mu\text{M}$  de azul de metileno (G7): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, submetidos a ficar em contato com a luz.

Grupo TFD com 100  $\mu\text{M}$  de azul de metileno (G8): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, submetidos a ficar em contato com a luz.

**Tabela 1** - Esquema da divisão dos grupos experimentais da primeira etapa.

<b>Tratamento dos grupos n=3</b>	<b>Solução Salina 0.9% (mL)</b>	<b>Azul de Metileno Dose (mL)</b>
<b>Controle</b>	1,5	-
<b>Azul de Metileno 50 <math>\mu\text{M}</math> no escuro</b>	-	1,5
<b>Azul de Metileno 75 <math>\mu\text{M}</math> no escuro</b>	-	1,5
<b>Azul de Metileno 100 <math>\mu\text{M}</math> no escuro</b>	-	1,5
<b>Luz</b>	1,5	-
<b>TFD 50 <math>\mu\text{M}</math> de azul de metileno</b>	-	1,5
<b>TFD 75 <math>\mu\text{M}</math> de azul de metileno</b>	-	1,5
<b>TFD 100 <math>\mu\text{M}</math> de azul de metileno</b>	-	1,5

Fonte: A autora (2020).

### **Segunda etapa:**

Grupo Controle (G1): Não recebem tratamento e foram apenas submetidos a ficar no escuro, com solução presente de água destilada

Grupo Azul de metileno de 12,5  $\mu\text{M}$  (G2): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, mas submetidos a ficar no escuro.

Grupo Azul de metileno de 25  $\mu\text{M}$  (G3): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, mas submetidos a ficar no escuro.

Grupo TFD com 12,5  $\mu\text{M}$  de azul de metileno(G4): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, submetidos a ficar em contato com a luz.

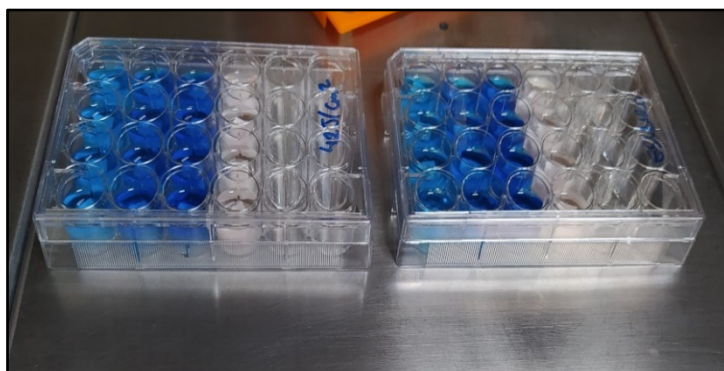
Grupo TFD com 25  $\mu\text{M}$  de azul de metileno (G5): Recebem tratamento de solução de azul de metileno na pele, submetidos a ficar em contato com a luz.

**Tabela 2** - Esquema da divisão dos grupos experimentais da segunda etapa.

<b>Tratamento dos grupos n=3</b>	<b>Solução Salina 0.9% (mL)</b>	<b>Azul de Metileno Dose (mL)</b>
<b>Controle</b>	1,5	-
<b>Azul de Metileno 12,5 <math>\mu</math>M no escuro</b>	-	1,5
<b>Azul de Metileno 25 <math>\mu</math>M no escuro</b>	-	1,5
<b>TFD 12,5 <math>\mu</math>M de azul de metileno</b>	-	1,5
<b>TFD 25 <math>\mu</math>M de azul de metileno</b>	-	1,5

Fonte: A autora (2020).

Ao total foram 13 grupos, 8 na primeira etapa e 5 na segunda etapa, na primeira fase utilizou-se quatro fragmentos de pele (quadruplicata) para cada grupo e na segunda fase três fragmentos de pele (triplicata) para cada grupo. As placas tiveram um tempo de pré-irradiação (PIT) de 20 minutos em contato com a solução de azul de metileno e água destilada.

**Figura 10** - Distribuição dos grupos no escuro e TFD na placa de 24 poços.

Fonte: A autora (2020).

## 5.6 Fontes de Luz

Para este trabalho foi utilizado o equipamento LEDbox emitindo 660nm (BioLambda, Brasil). O LEDbox é um dispositivo de irradiação perfeito aplicável a grandes amostras utilizadas em biofotônica, Fotobiologia, Fotoquímica e pesquisa de fotomedicina. É também excelente para o tratamento de culturas celulares e animais de laboratório usados em fotobiomodulação (FBM, também

conhecida como terapia com laser de baixa potência) e terapia fotodinâmica, Terapia pré-clínico *in vitro* e *in vivo* (BioLambda, Brasil).

Sua área interna é de 163.5 cm<sup>2</sup> permite a irradiação de pequenos animais, placas de petri ou placas de cultura multi-poços com níveis de irradiância até 100 mW por centímetro quadrado, representado na figura 11.

**Figura 11** - LEDbox 660nm (BioLambda, Brasil).



Fonte: A autora (2020).

As placas foram expostas à radiação durante um período de 20 minutos, na luz vermelha do LED, após o tempo de 10 minutos, com o auxílio de uma pinça estéril de instrumental clínica alternou-se as posições dos fragmentos de pele de cima para baixo, e expostas por mais 10 minutos, assim as duas partes da pele teriam contato com a luz.

Todas as condições testadas foram realizadas no escuro, sem agitação, à temperatura ambiente e em condições assépticas no interior de uma câmara de fluxo laminar. A irradiância foi de 70.03 mW/cm<sup>2</sup> e exibiram exposições radiantes de 84.04 J/cm<sup>2</sup> em ambas as etapas. As amostras foram irradiadas de cima para baixo na placa de 24 poços, conforme figura abaixo.

**Figura 12** - Caixa de diodo emissor de luz vermelha (LED) em funcionamento.



Fonte: A autora (2020).

### 5.7 Preparo da solução final para o plaqueamento

A metodologia do preparo da amostra para análise quantitativa foi adaptada de Tippelskirch *et al.* (2018). Todas as massas em gramas dos fragmentos de pele de cada grupo eram somados e convertidos a massa em g para ml da solução de phosphate buffered saline (PBS) em ambas as etapas do experimento, conforme apresentado na Tabela 3 e 4, à seguir.

**Tabela 3** - Esquema dos grupos da primeira etapa com os respectivos valores de massa e volumes de PBS utilizados para a preparação final da solução.

Grupos Experimentais n=3	Pesagem da pele em massa(g)	Volume de PBS(mL)
Controle	1,8534	9,267
Azul de Metileno 50 $\mu$ M no escuro	1,7874	8,9235
Azul de Metileno 75 $\mu$ M no escuro	1,8997	9,4985
Azul de Metileno 100 $\mu$ M no escuro	1,8929	9,4645
Luz	1,9694	9,847
TFD 50 $\mu$ M de azul de metileno	2,078	10,39
TFD 75 $\mu$ M de azul de metileno	1,9059	9,525
TFD 100 $\mu$ M de azul de metileno	1,8336	9,168

Fonte: A autora (2020).

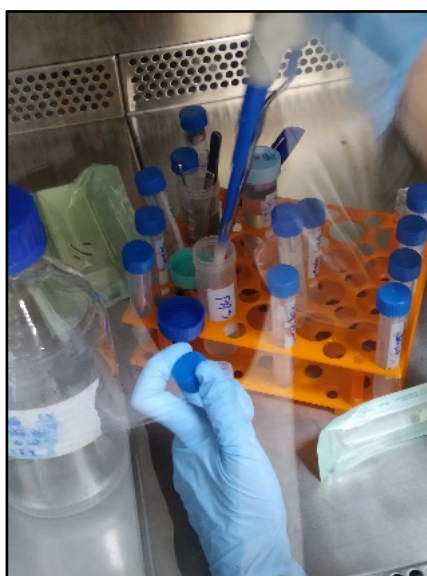
**Tabela 4** - Esquema dos grupos da segunda etapa com os respectivos valores de massa e volumes de PBS utilizados para a preparação final da solução.

<b>Grupos Experimentais n=3</b>	<b>Pesagem da pele em massa(g)</b>	<b>Volume de PBS(mL)</b>
<b>Controle</b>	1,6563	8,281
<b>Azul de Metileno 12,5 <math>\mu</math>M no escuro</b>	0,935	4,675
<b>Azul de Metileno 25 <math>\mu</math>M no escuro</b>	0,9976	4,988
<b>TFD 12,5 <math>\mu</math>M de azul de metileno</b>	0,8497	4,248
<b>TFD 25 <math>\mu</math>M de azul de metileno</b>	1,0178	5,089

Fonte: A autora (2020).

Após submetidas à irradiação, colocou-se as amostras de cada grupo em tubo falcon de 15 mL estéril, contendo assim recortes de pele, e no intervalo da inserção dos fragmentos de pele nos tubos, a pinça era mergulhada em álcool 70% para não conter amostra de outra concentração de azul de metileno ou água destilada. Em seguida colocou-se com o auxílio de uma micropipeta a quantidade de mL de PBS da respectiva conversão de cada g para ml em cada tubo dos devidos grupos, conforme figura 13.

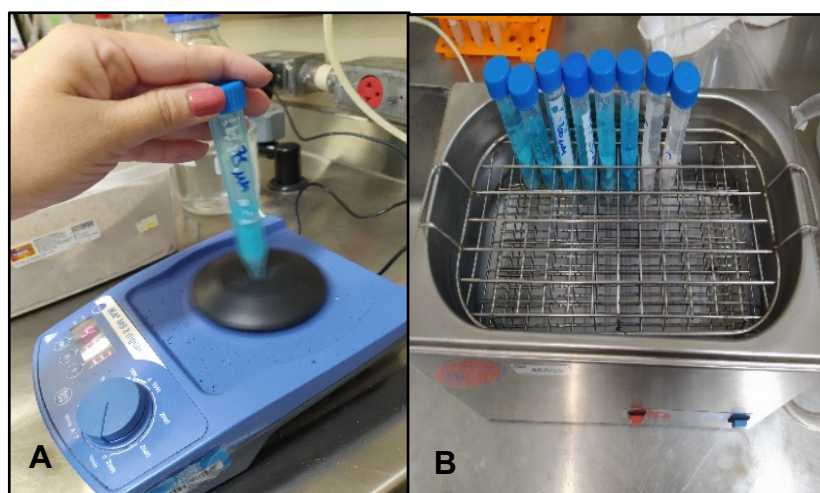
**Figura 13** - Distribuição do volume de PBS em cada tubo falcon.



Fonte: A autora (2020).

Ao total foram 8 tubos falcon ou seja 8 grupos na primeira etapa e na segunda 5 tubos, agitou-se cada tubo individualmente em um vórtex (IKA Agitadores MS 3 digital), em velocidade máxima de 3.000 rotações por aproximadamente 8 minutos, e em seguida todos os tubos foram dispostos juntos nas duas etapas do experimento no Banho Ultra Sônico (Modelo: USC-1600/ MERSE) em temperatura ambiente por um tempo de 20 minutos, para completa homogeneização/dissolução das amostras (figura 14).

**Figura 14** - Preparação final da amostra.

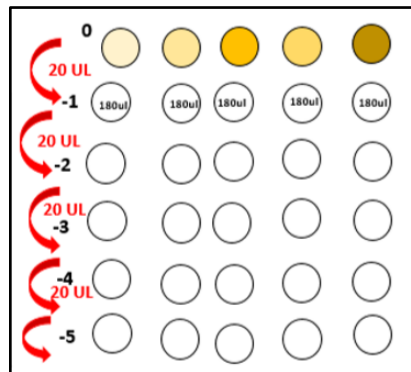


Legenda: A= Aparelho vórtex utilizado para homogeneizar os grupos; B= Aparelho ultra sônico para finalizar a homogeneização dos grupos.  
Fonte: A autora (2020).

### **5.8 Análise Quantitativa: diluição, plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs)**

Todas as condições testadas foram realizadas à temperatura ambiente e em condições assépticas no interior de uma câmara de fluxo laminar. Após a homogeneização das amostras realizou-se a diluição seriada de cada grupo, utilizou-se uma placa de microtitulação de 96 poços fundo chato estéril, sendo aspirado uma alíquota e adicionado 200  $\mu\text{L}$  na primeira fileira de cada grupo, e nas demais fileiras foram adicionados 180  $\mu\text{L}$  de PBS, e com o auxílio de uma micropipeta multicanal com 6 ponteiros descartáveis foi acrescentado 20  $\mu\text{L}$  e ao mesmo tempo homogeneizando à amostra em cada poço. A diluição seriada ocorreu de  $1:10^{-1}$ ,  $1:10^{-2}$ ,  $1:10^{-3}$ ,  $1:10^{-4}$ ,  $1:10^{-5}$ . Conforme esquematizado na figura 15.

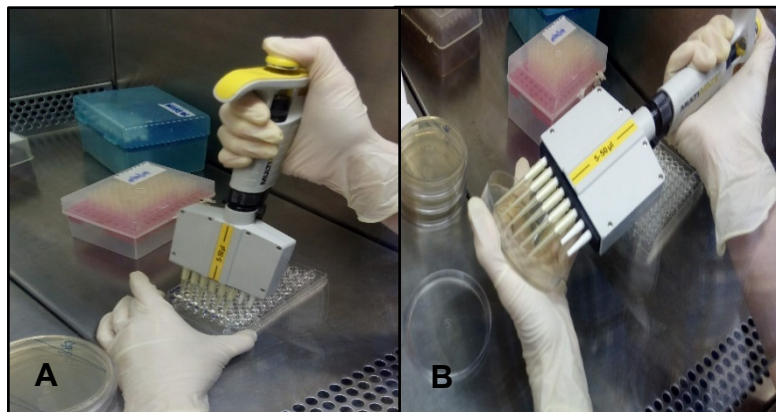
**Figura 15** - Esquema representativo da diluição seriada dos grupos experimentais.



Fonte: A autora (2020).

Adotou-se a diluição seriada de 1:10 e o método de escorrimento na placa conforme Tippelskirch *et al.* (2018). No processo de plaqueamento (figura 16), com auxílio de uma micropipeta multicanal adicionou-se uma alíquota de 10  $\mu$ L de solução de cada grupo na placa de petri, com placas de Petri em meio *Ágar dextrose Sabouraud* (SB) para fungo e *Brain Heart Infusion Ágar* (BHI) para bactéria, realizando assim o escorrimento de 10  $\mu$ L de cada amostra na placa e foi tomado os devidos cuidados para que as gotas não se misturassem durante o escorrimento.

**Figura 16** - Preparação das amostras para a incubação.



Legenda: A=Representação do método de diluição seriada de 1:10; B= Representação do método de escorrimento na placa de petri.

Fonte: A autora (2020).

O procedimento foi realizado em três placas de petri (triplicata) para cada grupo nos dois meios de cultura para as duas etapas do experimento, no total realizou-se na primeira etapa o escorrimento em 48 placas e na segunda etapa o escorrimento em 30 placas com cada placa devidamente identificada. Após absorver cada amostra pelo meio de cultura, as placas foram invertidas e colocadas de baixo para cima, evitou-se

que não condensasse a tampa para não entrar em contato com o meio. Em seguida as placas foram acondicionadas na incubadora (Refrigerada tipo "shaker" orbital de bancada CT-712RN/ CIENTEC) por aproximadamente 24 horas a 37°C, conforme figura apresentada abaixo.

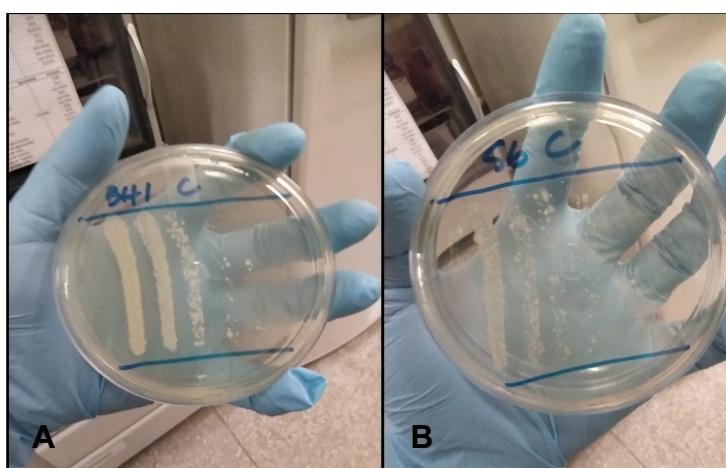
**Figura 17** - Placas de petri dispostas em grupos na incubadora.



Fonte: A autora (2020).

Após 24 h de incubação, as placas foram retiradas da incubadora para realizar a contagem de UFCs, foi feita manual a contagem e os dados foram tabulados e registrados no Microsoft Office Excel®.

**Figura 18** - Placas de Petri semeada após as 24 horas de incubação.



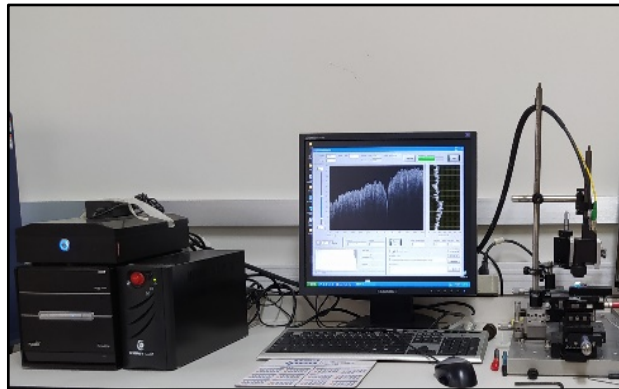
Legenda: A= Formação das colônias em meio de cultura após 24 hrs de crescimento em BHI; B= Formação das colônias em meio de cultura após 24 hrs de crescimento em SB.

Fonte: A autora (2020).

## 5.9 Análise Morfológica

Para as análises morfológicas utilizou-se a tomografia por coerência óptica, equipamento comercial (Modelo: 930SR/ Thorlabs-USA), e o software SRscan. As imagens foram visualizadas em um comprimento de onda central de 930nm com profundidade de 3,0 e 6,0 mm e largura de 1024 e 2048  $\mu\text{m}$ , o objetivo da análise foi avaliar se houve alterações morfológicas microestruturais após o tratamento com TFDa.

**Figura 19** - Equipamento de OCT.



Fonte: A autora (2020).

A Tomografia de coerência óptica é uma técnica de imagem óptica não invasiva que produz imagens volumétricas 2D e em 3D em tempo real de uma amostra. Essa técnica fornece informações estruturais sobre a amostra com base na luz retroespalhada de diferentes camadas de material dentro dessa amostra, produzindo imagens com resolução no nível de microns e milímetros de profundidade de imagem (THORLABS).

## 5.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio de uma planilha programada no Microsoft Office Excel®, os dados foram registrados e tabulados com informações extraídas de descrição dos grupos, foram gerados os gráficos das médias de sobrevivência de unidades formadoras de colônias, para cada grupo, com seu respectivo desvio padrão.

Os dados foram analisados quanto a sua distribuição, com o teste de Shapiro-Wilk que mostrou uma distribuição normal nas séries. Foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) para análise dos dados.

Todas as análises foram realizadas com o *software* estatístico Past 4.03, o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p=0,05$ ).

## **6 RESULTADOS**

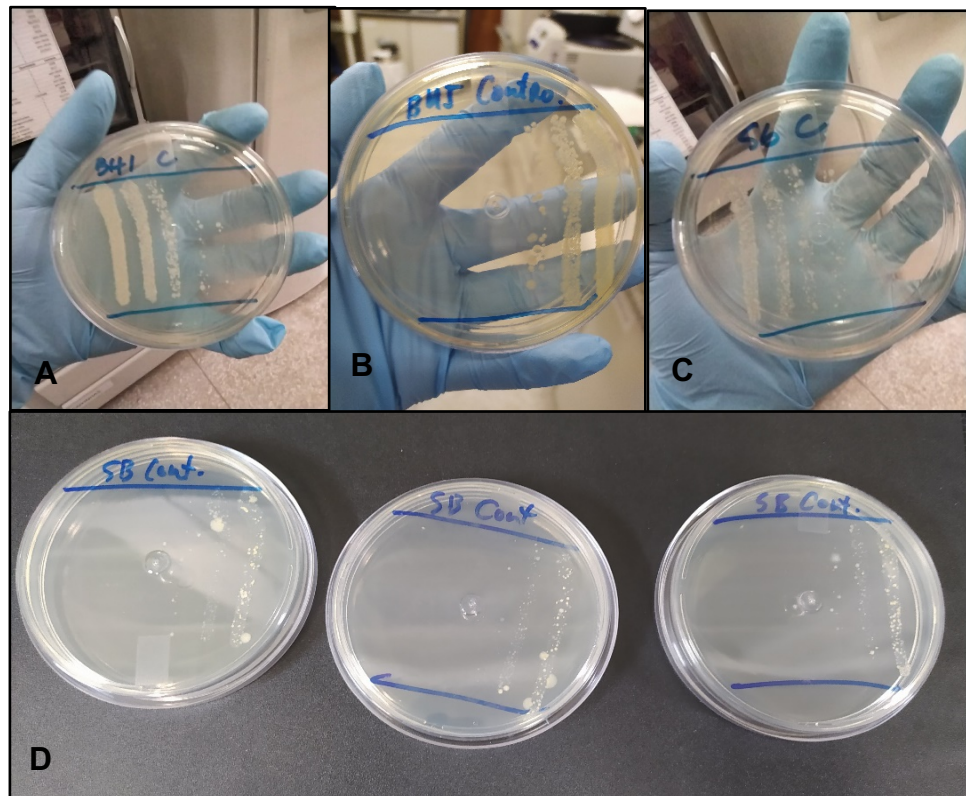
Foram contadas as UFCs de todos os grupos para fungos e bactérias, nas três placas de petri por grupo, sendo ao total 78 placas de petri cultivadas em 24 horas. Fazendo assim a contagem em cada diluição foi obtida a média aritmética e desvio padrão em fração para cada grupo. Optou-se por excluir do estudo os grupos relacionados a 50  $\mu$ M de AM e PDT 50  $\mu$ M devido inconsistência nas amostras, assegurando cuidadosamente para que não houvesse dados inconsistentes nos resultados.

### **6.1 Análise da variação das UFCs nos meios de cultura dos grupos experimentais e controles**

Com estes dados analisou-se a variação das UFCs nos meios de cultura dos grupos tratados e controle, em cada condição experimental.

Os resultados das UFCs em cada meio de cultura dos grupos: controle, aplicação da TFD e com fotossensibilizador azul de metileno isolado, estão representados nas figuras abaixo.

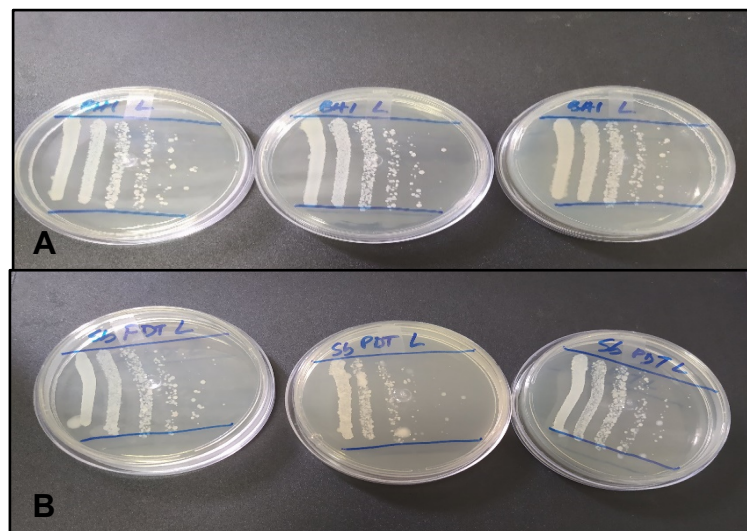
**Figura 20** - Crescimento bacteriano e fúngico da pele controle.



Legenda: A= Crescimento de bactéria do experimento da primeira etapa; B= Crescimento de bactéria do experimento da segunda etapa; C= Crescimento de fungo do experimento da primeira etapa; D= Crescimento de fungo do experimento da segunda etapa.

Fonte: A autora (2020).

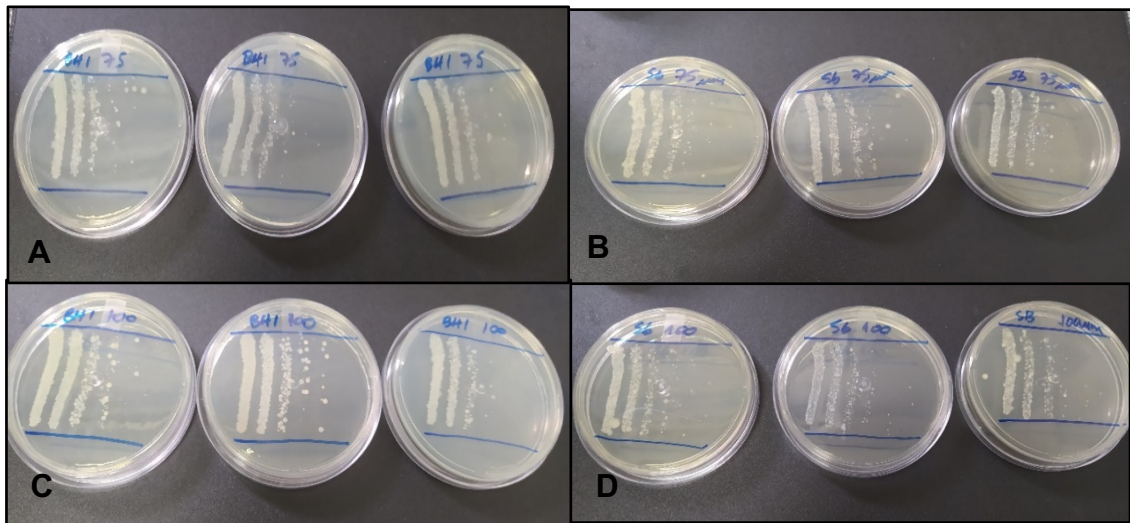
**Figura 21** - Crescimento bacteriano e fúngico da pele irradiada a luz.



Legenda: A= Crescimento de bactéria irradiada a luz; B= Crescimento de fungo irradiada a luz.

Fonte: A autora (2020).

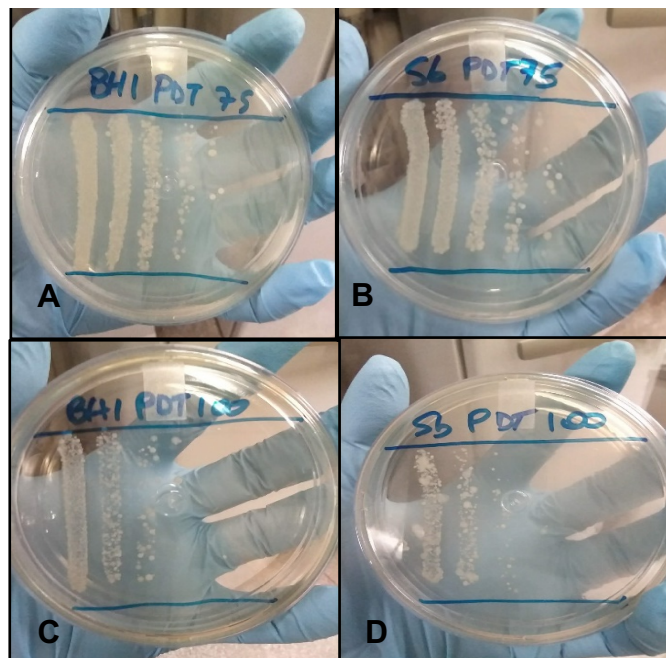
**Figura 22** - Crescimento bacteriano e fúngico da pele em contato somente com o Fotossensibilizador azul de metileno nos grupos de 75 e 100  $\mu\text{M}$ .



Legenda: A= Crescimento de bactéria somente com o FS azul de metileno 75  $\mu\text{M}$ ; B= Crescimento de fungo somente com o FS azul de metileno 75  $\mu\text{M}$ ; C= Crescimento de bactéria somente com o FS azul de metileno 100 $\mu\text{M}$ ; D= Crescimento de fungo somente com o FS azul de metileno 100  $\mu\text{M}$ .

Fonte: A autora (2020).

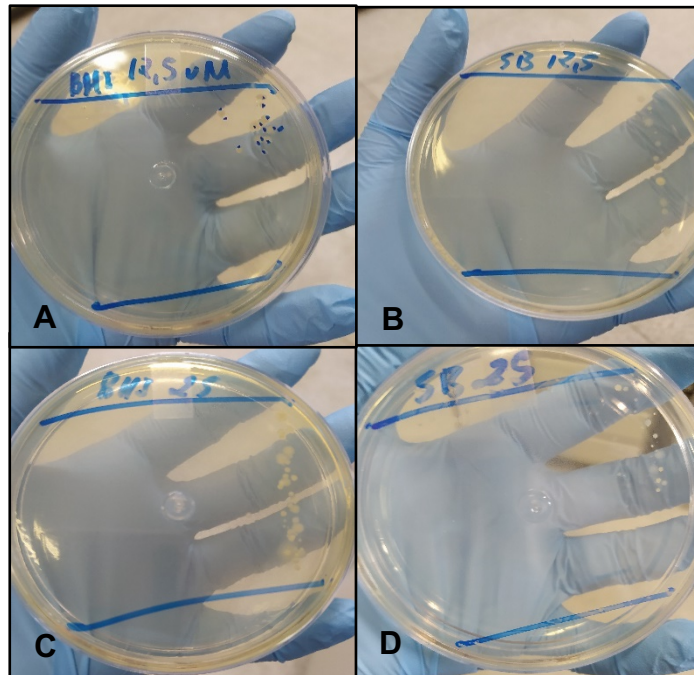
**Figura 23** - Crescimento bacteriano e fúngico da pele com a Terapia Fotodinâmica nos grupos de 50,75 e 100  $\mu\text{M}$ .



Legenda: A= Crescimento de bactéria no PDT com azul de metileno em 75  $\mu\text{M}$ ; B= Crescimento de fungo no PDT 75  $\mu\text{M}$ ; C= Crescimento de bactéria no PDT 100 $\mu\text{M}$ ; D= Crescimento de fungo no PDT 100  $\mu\text{M}$ .

Fonte: A autora (2020).

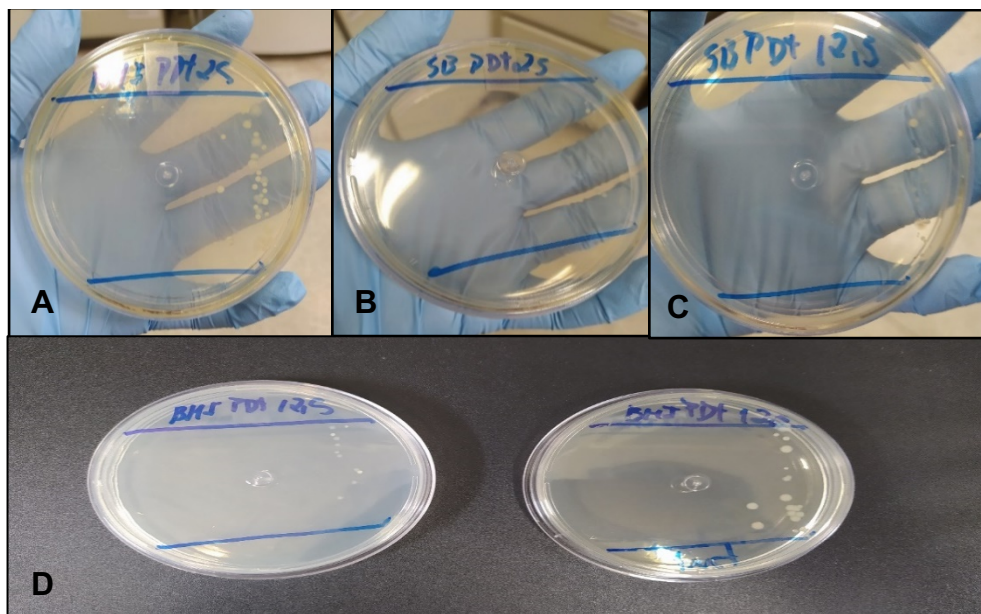
**Figura 24** - Crescimento bacteriano e fúngico da pele em contato somente com o Fotossensibilizador azul de metileno nos grupos de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ .



Legenda: A= Crescimento de bactéria somente com o FS azul de metileno em 12,5  $\mu\text{M}$ ; B= Crescimento de fungo somente com o FS azul de metileno em 12,5  $\mu\text{M}$ ; C= Crescimento de bactéria somente com o FS azul de metileno em 25  $\mu\text{M}$ ; D= Crescimento de fungo somente com o FS azul de metileno em 25  $\mu\text{M}$ .

Fonte: A autora (2020).

**Figura 25** - Crescimento bacteriano e fúngico da pele com a Terapia Fotodinâmica nos grupos de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ .



Legenda: A= Crescimento de bactéria no PDT com azul de metileno em 25  $\mu\text{M}$ ; B= Crescimento de fungo no PDT 25  $\mu\text{M}$ ; C= Crescimento de fungo no PDT 12,5  $\mu\text{M}$ ; D= Crescimento de bactéria no PDT 12,5  $\mu\text{M}$ .

Fonte: A autora (2020).

Nesses ensaios verificou-se que houve uma diminuição do crescimento fúngico e bacteriano em comparação com o controle. Percebeu-se uma diferença significativa na segunda etapa do experimento com a concentração de AM e PDT de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ , evidenciando-se que ocorreu uma redução ou até mesmo em algumas placas não houve crescimento de microrganismo em comparação com a concentração/diluição inicial.

## 6.2 Distribuição das contagens de UFCs para fungos e bactérias de todos os grupos

Os dados foram registrados e tabulados em uma planilha programada no Microsoft Office Excel® com informações extraídas da descrição de cada grupo em cada meio de cultura, foi inserido na planilha as diluições utilizadas, gota em  $\mu\text{L}$ , unidade formadora de colônia por mL, média e fração. Quanto maior o número de células vivas maior será a fração, quando essa taxa de fração de sobrevivência reduz, significa que está havendo uma redução das UFCs, podemos observar essa diferença no grupo controle com relação aos grupos tratados.

**Tabela 5** - Distribuição da contagem de UFCs para bactéria (BHI), colunas com dados de diluição, gota( $\mu\text{L}$ ), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 75 e 100  $\mu\text{M}$ .

TFD. Equivalente a 75 e 100 $\mu\text{M}$ de AM											
LED 660nm; 70.03 mW/cm <sup>2</sup> ; PIT 20 min											
Data do experimento: 04/02/2020							Contagem: 05/02/2020				
Grupo	0	-1	-2	-3	-4	-5	Diluição	Gota ( $\mu\text{L}$ )	UFC/mL	Média	Fração
BHI cont.				-	23	4	4	10	23000000,00	18000000,00	1,28
				48	15	2	4	10	15000000,00		0,83
				58	16	1	4	10	16000000,00		0,8889
luz					29	7	4	10	29000000,00	27666666,67	1,6111
					28	7	4	10	28000000,00		1,5556
					26	5	4	10	26000000,00		1,4444
BHI 75 $\mu\text{M}$				15	11	0	4	10	1500000,00	1900000,00	0,0833
				24	7	0	4	10	2400000,00		0,1333
				18	6	1	4	10	1800000,00		0,1000
BHI PDT 75 $\mu\text{M}$				45	9	1	4	10	4500000,00	5033333,33	0,2500
				50	15	1	4	10	5000000,00		0,2778
				56	11	1	4	10	5600000,00		0,3111

<b>BHI 100 µM</b>			49	9	2	4	10	9000000,00	9666666,67	0,5000
			89	10	2	4	10	10000000,00		0,5556
			41	10	0	4	10	10000000,00		0,5556
<b>BHI PDT 100 µM</b>		72	6	1	0	2	10	720000,00	713333,33	0,0400
		69	5	1	0	2	10	690000,00		0,0383
		73	8	2	0	2	10	730000,00		0,0406

Fonte: A autora (2020).

**Tabela 6** - Distribuição da contagem de UFCs para fungo (SB), colunas com dados de diluição, gota(µL), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 75 e 100 µM.

<b>TFD. Equivalente a 75 e 100 µM de AM</b>											
<b>LED 660nm; 70.03 mW/cm<sup>2</sup>; PIT 20 min</b>											
<b>Data do experimento: 04/02/2020</b>						<b>Contagem: 05/02/2020</b>					
<b>Grupo</b>	<b>0</b>	<b>-1</b>	<b>-2</b>	<b>-3</b>	<b>-4</b>	<b>-5</b>	<b>Diluição</b>	<b>gota (µL)</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Média</b>	<b>Fração</b>
<b>SB cont.</b>				65	16	8	4	10	16000000,0	19666666,67	0,81355932
				-	19	5	4	10	19000000,0		0,96610169
				-	24	2	4	10	24000000,0		1,22033898
<b>SB luz</b>				29	9	3	5	10	30000000,0	46666666,67	1,52542373
				-	23	5	5	10	50000000,0		2,54237288
				-	24	6	5	10	60000000,0		3,05084746
<b>SB 75 µM</b>				29	7	0	3	10	2900000,0	3600000,00	0,14745763
				46	8	2	3	10	4600000,0		0,23389831
				33	7	1	3	10	3300000,0		0,16779661
<b>SB PDT 75 µM</b>				61	12	1	3	10	6100000,0	5433333,33	0,31016949
				57	12	4	3	10	5700000,0		0,28983051
				45	15	0	3	10	4500000,0		0,22881356
<b>SB 100 µM</b>				23	6	3	4	10	6000000,0	7000000,00	0,30508475
				15	6	3	4	10	6000000,0		0,30508475
				42	9	3	4	10	9000000,0		0,45762712
<b>SB PDT 100 µM</b>			51	9	1	0	2	10	510000,0	566666,67	0,0259322
			73	16	0	0	2	10	730000,0		0,03711864
			46	5	1	0	2	10	460000,0		0,02338983

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Fonte: A autora (2020).

**Tabela 7** - Distribuição da contagem de UFCs para bactéria (BHI), colunas com dados de diluição, gota( $\mu\text{L}$ ), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ .

<b>TFD. Equivalente a 12,5 e 25 <math>\mu\text{M}</math> de AM</b>											
<b>LED 660nm; 70.03 mW/cm<sup>2</sup>; PIT 20 min</b>											
<b>Data do experimento: 04/02/2020</b>								<b>Contagem: 05/02/2020</b>			
<b>Grupo</b>	<b>0</b>	<b>-1</b>	<b>-2</b>	<b>-3</b>	<b>-4</b>	<b>-5</b>	<b>Diluição</b>	<b>gota (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Média</b>	<b>Fração</b>
<b>BHI cont.</b>	-	-	18	0	0	0	2	10	180000,00	130000,00	1,3846
	-	-	8	2	1	0	2	10	80000,00		0,6154
	-	-	13	0	0	0	2	10	130000,00		1,0000
<b>BHI 12,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	29	0	0	0	0	0	0	10	2900,00	1866,67	0,0223
	13	3	0	0	0	0	0	10	1300,00		0,0100
	14	0	0	0	0	0	0	10	1400,00		0,0108
<b>BHI PDT 12,5<math>\mu\text{M}</math></b>	18	0	0	0	0	0	0	10	1800,00	1500,00	0,0138
	16	2	0	0	0	0	0	10	1600,00		0,0123
	11	0	0	0	0	0	0	10	1100,00		0,0085
<b>BHI 25<math>\mu\text{M}</math></b>	39	1	0	0	0	0	1	10	1000,00	3333,33	0,0077
	41	5	0	0	0	0	1	10	5000,00		0,0385
	42	4	0	0	1	0	1	10	4000,00		0,0308
<b>BHI PDT25<math>\mu\text{M}</math></b>	33	4	0	0	0	0	1	10	4000,00	3000,00	0,0308
	26	4	0	0	0	0	1	10	4000,00		0,0308
	28	1	0	0	0	0	1	10	1000,00		0,0077

Fonte: A autora (2020).

**Tabela 8** - Distribuição da contagem de UFCs para fungo (SB), colunas com dados de diluição, gota( $\mu\text{L}$ ), UFC/mL, média e fração dos seguintes grupos: controle, Luz, azul de metileno e TFD de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$

<b>TFD. Equivalente a 12,5 e 25 <math>\mu\text{M}</math> de AM</b>											
<b>LED 660nm; 70.03 mW/cm<sup>2</sup>; PIT 20 min</b>											
<b>Data do experimento: 04/02/2020</b>							<b>Contagem: 05/02/2020</b>				
<b>Grupo</b>	<b>0</b>	<b>-1</b>	<b>-2</b>	<b>-3</b>	<b>-4</b>	<b>-5</b>	<b>Diluição</b>	<b>gota (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Média</b>	<b>Fração</b>
<b>SB cont.</b>	-	-	19	1	0	0	2	10	190000,00	170000,00	1,1176
	-	-	9	0	0	0	2	10	90000,00		0,5294
	-	-	23	0	0	0	2	10	230000,00		1,3529
<b>SB 12,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	17	0	0	0	0	1	0	10	1700,00	1966,67	0,0100
	25	0	1	0	0	0	0	10	2500,00		0,0147
	17	0	0	0	0	0	0	10	1700,00		0,0100
<b>SB PDT 12,5<math>\mu\text{M}</math></b>	10	0	0	0	0	0	0	10	1000,00	1333,33	0,0059
	16	4	0	0	0	0	0	10	1600,00		0,0094
	14	3	0	0	0	0	0	10	1400,00		0,0082
<b>SB 25<math>\mu\text{M}</math></b>	21	1	0	0	2	2	1	10	1000,00	1666,67	0,0059
	40	1	2	0	0	0	1	10	1000,00		0,0059
	25	3	0	0	0	0	1	10	3000,00		0,0176
<b>SB PDT 25 <math>\mu\text{M}</math></b>	15	0	0	0	0	0	0	10	1500,00	1300,00	0,0088
	7	0	0	0	0	0	0	10	700,00		0,0041
	17	4	1	0	0	0	0	10	1700,00		0,0100

Fonte: A autora (2020).

Observa-se que em alguns grupos, a contagem nas últimas colunas de diluição é um número pequeno ou até mesmo “0”, mostrando significativamente que a TFD ou o FS isolado pode ocasionar uma redução na carga microbológica da pele suína. A tabela 9 demonstra a taxa de sobrevivência de unidades formadoras de colônias, com relação as médias e desvio padrão em forma de fração para os diferentes grupos.

**Tabela 9** - Média e desvio padrão de UFCs de todos os grupos estudados.

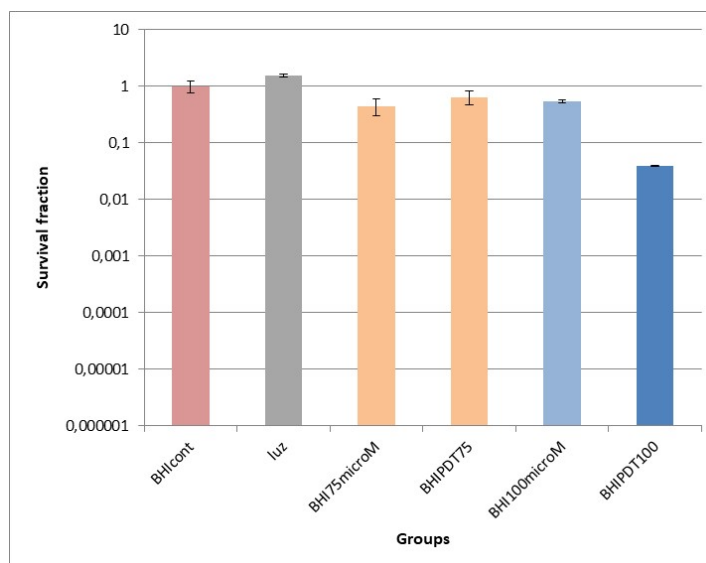
<b>GRUPO</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>DP</b>
<b>BHI controle</b>	1,00000	0,2422
<b>Luz BHI</b>	1,53704	0,0849
<b>BHI 75 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,44444	0,1470
<b>BHI PDT 75<math>\mu\text{M}</math></b>	0,64815	0,1697
<b>BHI 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,53704	0,0321

<b>BHI PDT 100µM</b>	0,03963	0,0012
<b>SB controle</b>	1,0000	0,2055
<b>Luz SB</b>	2,3729	0,7767
<b>SB 75µM</b>	0,1831	0,0452
<b>SB PDT 75 µM</b>	0,2763	0,0423
<b>SB 100 µM</b>	0,3559	0,0881
<b>SB PDT 100 µM</b>	0,0288	0,0073
<b>BHI controle</b>	1,0000	0,3846
<b>BHI 12,5µM</b>	0,0144	0,0069
<b>BHI PDT 12,5µM</b>	0,0115	0,0028
<b>BHI 25µM</b>	0,0256	0,0160
<b>BHI PDT 25µM</b>	0,0231	0,0133
<b>SB controle</b>	1,0000	0,4242
<b>SB 12,5µM</b>	0,0116	0,0027
<b>SB PDT 12,5µM</b>	0,0078	0,0018
<b>SB 25µM</b>	0,0098	0,0068
<b>SB PDT 25µM</b>	0,0076	0,0031

Fonte: A autora (2020).

### **6.3 Análise do crescimento bacteriano dos grupos Controle, Luz, AM 75 µM, PDT 75 µM, AM 100 µM e PDT 100 µM**

A figura 26 apresenta resultados da estimativa de sobrevivência de UFCs de bactérias dos grupos controle e os grupos tratados com azul de metileno e PDT de 75 µM e 100 µM, tendo uma menor probabilidade de sobrevivência quando comparado com o grupo controle, verificou-se que as séries são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Figura 26** - Análise da fração média do crescimento de bactérias.

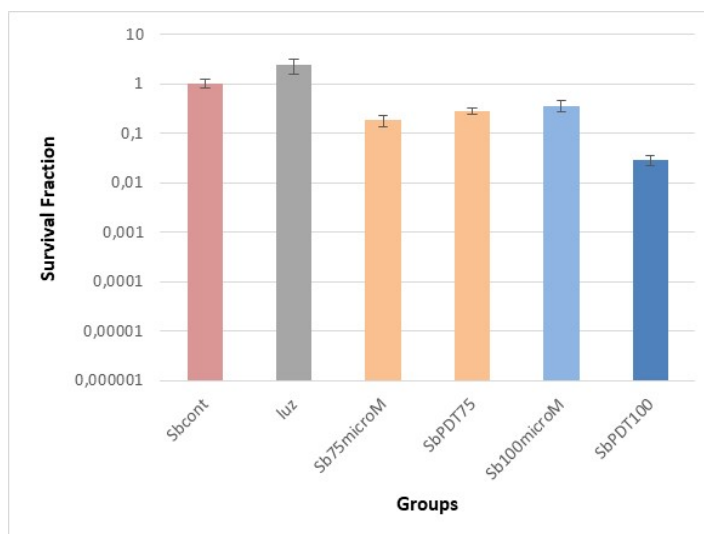
Legenda: Os dados representam a média e as barras de erro representam o desvio padrão.  
 Fonte: A autora (2020).

Analisando os resultados do grupo controle e grupo luz para bactéria verificou-se que as séries são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ), mostrando que a luz tem uma taxa de maior sobrevivência de UFCs em comparação com o grupo controle.

O grupo AM 75  $\mu\text{M}$  e PDT 75  $\mu\text{M}$  não tem diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ). Na comparação dos grupos de AM 100  $\mu\text{M}$  e PDT 100  $\mu\text{M}$ , apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ), o grupo da terapia fotodinâmica na concentração de 100  $\mu\text{M}$  promoveu uma redução estatisticamente significativa, apresentando evidências de ser o mais eficaz na redução das UFCs de bactérias em comparação com os grupos AM 75  $\mu\text{M}$ , PDT 75  $\mu\text{M}$  e AM 100  $\mu\text{M}$ .

#### **6.4 Análise do crescimento fúngico dos grupos Controle, Luz, AM 75 $\mu\text{M}$ , PDT 75 $\mu\text{M}$ , AM 100 $\mu\text{M}$ e PDT 100 $\mu\text{M}$**

De acordo com a figura 27 os grupos AM e PDT de 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  mostraram resultados de sobrevivência das UFCs de fungo, sendo todos diferentes estatisticamente do grupo controle o ( $p < 0,05$ ).

**Figura 27** - Análise da fração média do crescimento de fungos.

Fonte: A autora (2020).

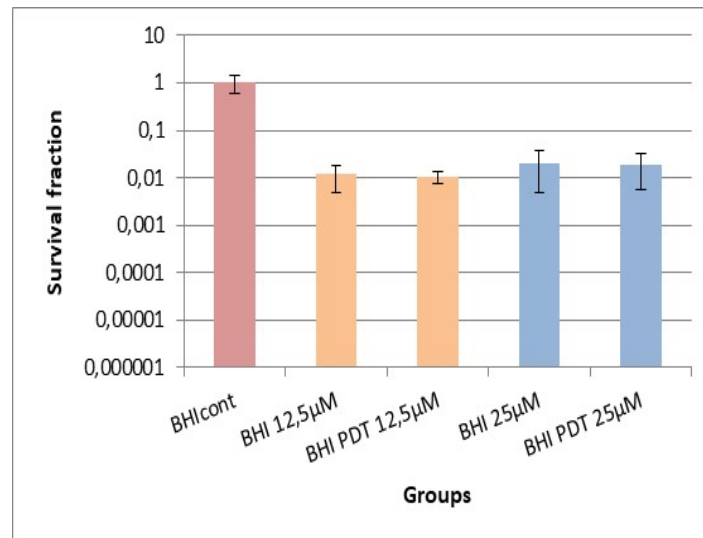
Analisando os resultados do grupo controle e grupo luz para o crescimento de fungos verificou-se que as séries são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ), mostrando que a luz tem uma taxa de maior crescimento de UFCs em comparação com o grupo controle.

O grupo AM 75  $\mu\text{M}$  e PDT 75  $\mu\text{M}$  não tem diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ). Já os grupos de AM 100  $\mu\text{M}$  e PDT 100  $\mu\text{M}$ , tem diferença estatística ( $p < 0,05$ ), portanto o grupo PDT 100  $\mu\text{M}$  mostrou-se ser o mais eficaz na redução de UFCs ( $p < 0,05$ ), com relação a contagem de fungo em comparação com os grupos AM 75  $\mu\text{M}$  e PDT 75  $\mu\text{M}$ .

### **6.5 Análise do crescimento bacteriano dos grupos Controle, AM 12,5 $\mu\text{M}$ , PDT 12,5 $\mu\text{M}$ , AM 25 $\mu\text{M}$ e PDT 25 $\mu\text{M}$**

Analisando os resultados do crescimento de bactérias nos grupos controle, AM 12,5  $\mu\text{M}$  e PDT 12,5  $\mu\text{M}$  verificou-se que as séries são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Mostrando evidências de redução no crescimento das UFCs em comparação com o grupo controle, de acordo com a figura 28.

**Figura 28** - Análise da fração média do crescimento de bactérias.

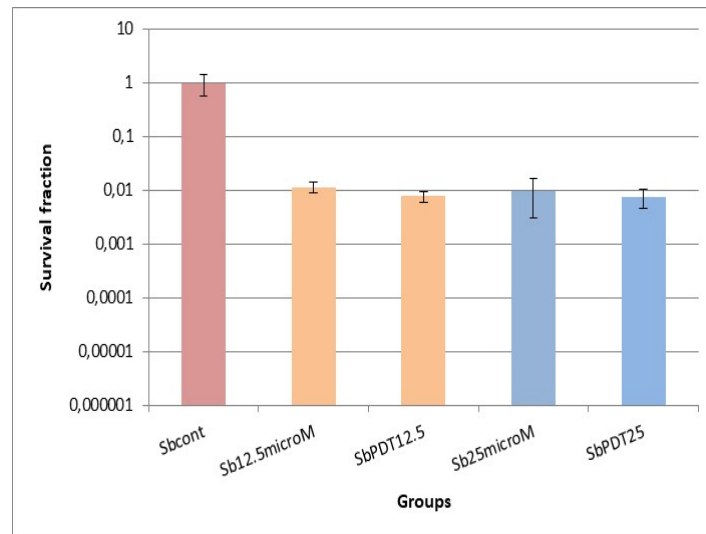


Fonte: A autora (2020).

Os grupos AM 12,5 µM, PDT 12,5 µM, AM 25 µM e PDT 25 µM são iguais estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), com relação ao crescimento bacteriano das UFCs.

### 6.6 Análise do crescimento fúngico dos grupos Controle, AM 12,5 µM, PDT 12,5 µM, AM 25 µM e PDT 25 µM

Analisando os resultados do crescimento de fungos nos grupos controle, AM 12,5 µM e PDT 12,5 µM, AM 25 µM e PDT 25 µM verificou-se que as séries são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Mostrando evidências da redução no crescimento de UFCs de fungos em comparação com o grupo controle, conforme na figura 29.

**Figura 29** - Análise da fração média do crescimento de fungos.

Fonte: A autora (2020).

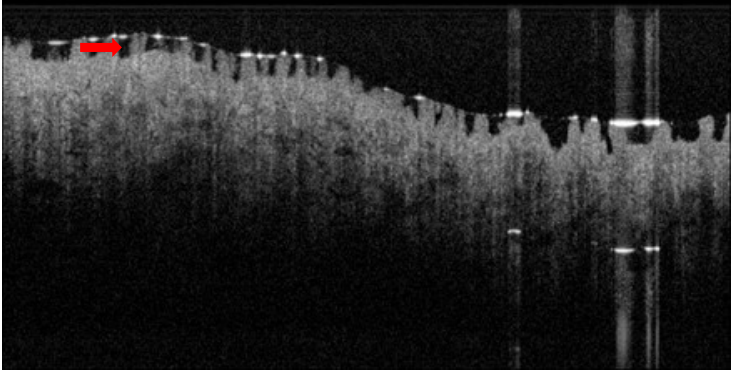
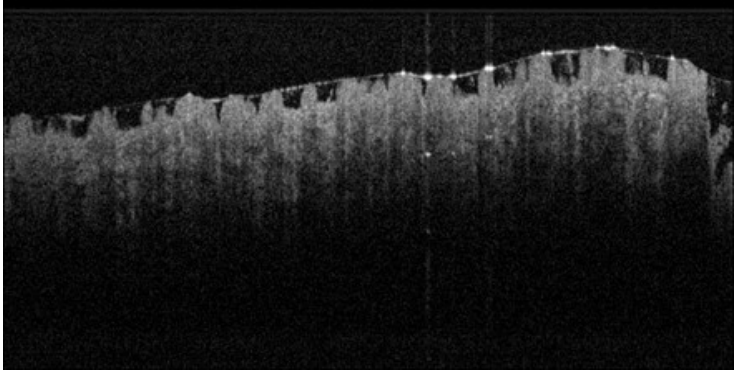
Os grupos AM 12,5  $\mu\text{M}$ , PDT 12,5  $\mu\text{M}$ , AM 25  $\mu\text{M}$  e PDT 25  $\mu\text{M}$  são iguais estatisticamente ( $p > 0,05$ ), com relação ao crescimento fúngico das UFCs.

Os resultados obtidos apontam que os grupos das concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ), dos grupos das concentrações de 75 e 100  $\mu\text{M}$ , sendo os grupos das concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  apresentaram-se uma maior eficácia na redução das UFCs.

### 6.7 Caracterização das amostras por OCT

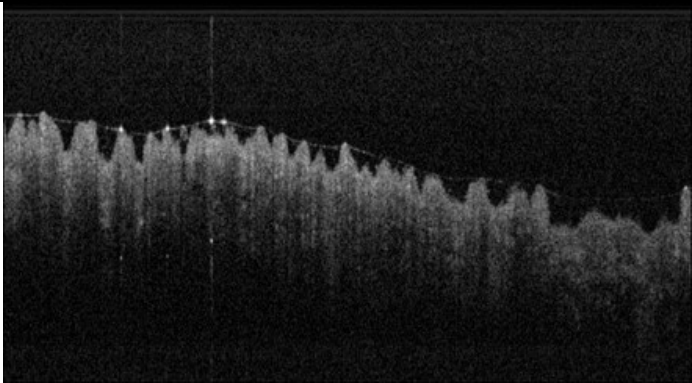
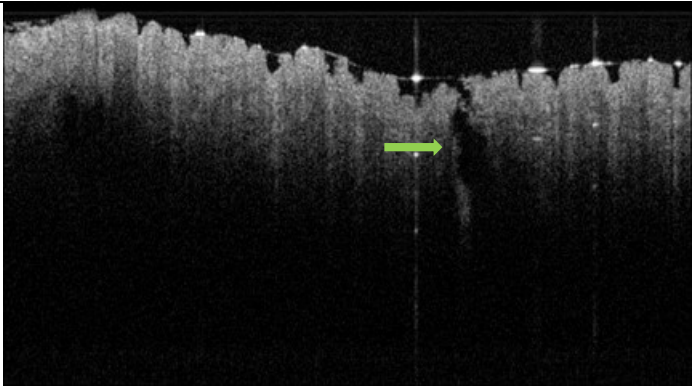
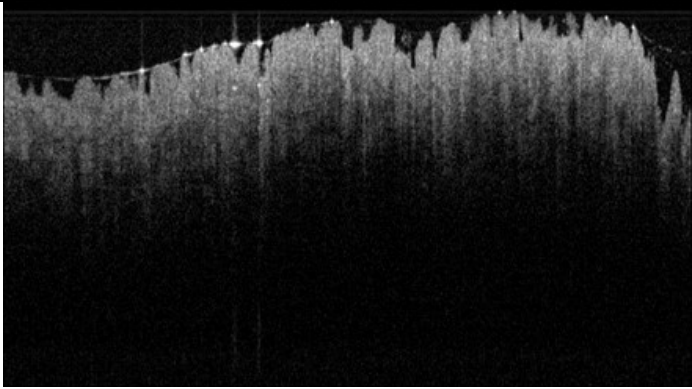
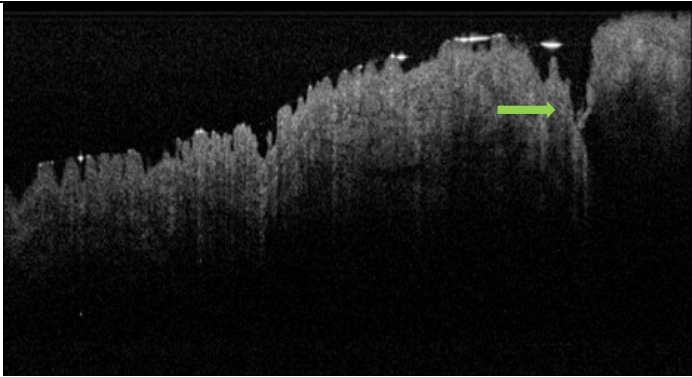
Nas figuras abaixo observa-se as imagens da tomografia de coerência óptica da pele dos grupos, controle, luz e AM 75  $\mu\text{M}$ , PDT 75  $\mu\text{M}$ , AM 100  $\mu\text{M}$ , PDT 100  $\mu\text{M}$ .

**Figura 30** - Imagens do OCT nos grupos controle e luz.

<b>(A) Grupos</b>	<b>(B) Imagem de OCT</b>
<b>CONTROLE</b>	
<b>LUZ</b>	

Legenda: Abaixo da primeira barreira é possível observar o estrato córneo (seta vermelha)  
Fonte: A autora (2020).

**Figura 31** - Imagens do OCT dos grupos: AM 75  $\mu$ M, PDT 75  $\mu$ M, AM 100  $\mu$ M e PDT 100  $\mu$ M.

<b>(A) Grupos</b>	<b>(B) Imagem de OCT</b>
<b>AM 75 <math>\mu</math>M.</b>	
<b>PDT 75 <math>\mu</math>M</b>	
<b>AM 100 <math>\mu</math>M</b>	
<b>PDT 100 <math>\mu</math>M</b>	

Legenda: Observa-se falhas e irregularidades (seta verde).

Fonte: A autora (2020).

As imagens de OCT da pele do grupo controle foram comparadas com as imagens da pele que passaram por TDF e FS isolado. Em todas as imagens observa-se um retroespalhamento mais uniforme ao longo da profundidade do tecido, sendo possível observar também a formação de uma camada de epitélio e uma uniformidade no tecido. Estudando a imagem do grupo PDT 75  $\mu$ M, pode-se observar supostamente falhas e irregularidades na profundidade do tecido, que pode estar associada a uma falha na estrutura da pele.

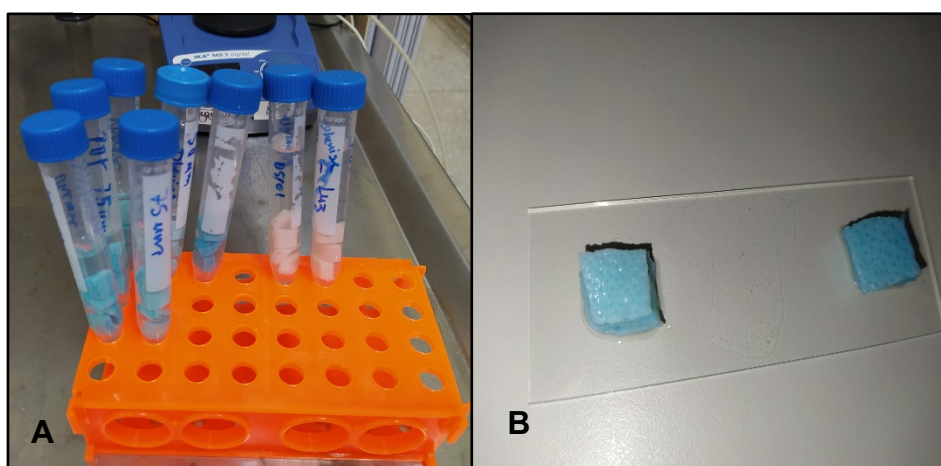
As imagens mostram que é possível observar a camada do epitélio nos diferentes grupos, sem alteração ou deformação em comparação com a pele do grupo controle, uma vez que todos os fragmentos de pele observados, a intensidade do sinal foi o mesmo retroespalhamento abaixo da superfície.

Em virtude das adversidades não foi possível realizar a OCT com os grupos das concentrações de azul de metileno de 12, 5 e 25  $\mu$ M.

### 6.8 Coloração da pele após o experimento

Macroscopicamente o dano estabelecido na superfície da pele foi a alteração da coloração, observa-se que após o procedimento do PDT, a pele encontrava-se em uma coloração azulada (figura 24).

**Figura 32** - Coloração azulada da pele após a experimentação.



Legenda: A= Fragmentos de pele em tubos falcon com solução de PBS; B= Fragmento de pele em coloração azul exposta na lâmina.

Fonte: A autora (2020).

Após a análise da coloração azulada da pele, os fragmentos foram colocados em tubos falcon de 15 ml e ficando imersos em solução PBS por 48 horas e nota-se

que após as 48 horas houve uma diferença na coloração, deixando as mesmas mais próxima da sua cor natural. Sugere-se novos estudos na redução da coloração azulada da pele ou testes com outros fotossensibilizadores ou corantes menos pigmentantes.

**Figura 33** - Coloração da pele após as 48 horas em solução de PBS.



Fonte: A autora (2020).

## 7 DISCUSSÃO

Os microrganismos são quase onipresentes, muito diversos e indispensáveis a sobrevivência humana. A preparação de meios de cultura adequados é um dos pré-requisitos para estudá-los. Diferentes microrganismos prosperam em ambientes diferentes, tendo uma variedade de requisitos de crescimento; como nutrientes, pH, condições osmóticas e temperatura (BASU *et al.*, 2015).

O ser humano possui dois tipos de microbiota sendo elas residente e transitória. A residente faz parte do organismo, que se colonizam sem causar danos como infecções ao hospedeiro em condições saudáveis. Já a transitória não pertence ao local, permanecendo por pouco tempo no organismo podendo acarretar alterações na microbiota do hospedeiro, resultando em danos patológicos, como é considerando um corpo estranho por não pertencer a microbiota do organismo (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Em contraste com a maioria dos tecidos de doadores colhidos (por exemplo, tecido musculoesquelético e válvulas cardíacas), o tecido da pele é inerentemente colonizado por uma quantidade substancial de microrganismos comensais e, portanto, não estéreis no momento da extração da pele doadora. A estratégia de triagem para aloenxertos de pele deve garantir uma ausência total de patógenos (PRETTO *et al.*, 2019).

A análise estatística de sobrevivência de microrganismos é utilizada em estudos de laboratórios para comprovar a eficácia de alguma terapia/tratamento, ou seja, é possível avaliar a quantidade de microrganismos sobreviventes a um determinado tratamento e o tempo de resposta, sendo possível assim ajustar parâmetros a serem melhorados.

Em relação ao presente estudo, os resultados das análises de sobrevivência dos diferentes grupos com IFDa e azul de metileno em relação ao grupo controle apresentaram valores medianos da sobrevivência de UFCs menores, caracterizando uma menor probabilidade de sobrevivência de microrganismos. O grupo irradiado só com luz apresentou valores medianos semelhantes ao grupo controle, mantendo um padrão parecido para fungo e bactéria.

Visto que a luz tem uma taxa de maior sobrevivência de UFCs em comparação com o grupo controle, de acordo com a literatura, a resposta fotobiológica de um microrganismo a exposição à luz monocromática depende diretamente dos

parâmetros da irradiação (comprimento de onda, intensidade e dose). A resposta fotoquímica da célula é dependente do comprimento de onda utilizado. A ativação da cadeia respiratória por exposição a determinados comprimentos de onda de luz monocromática promove elevação local do gradiente de pH, gerando fenômeno de gatilho para a duplicação da célula bacteriana (COUTINHO *et al.*, 2007)

A capacidade da técnica da OCT em realizar imagens microscópicas de estruturas de tecidos, explorando a curta coerência temporal das fontes de grande largura de banda espectral, vão além do alcance dos microscópios ópticos confocais tradicionais, pois atingem profundidade de até 2,0 cm em tecidos transparentes. Na pele e em outros tecidos altamente espalhadores, a técnica da OCT permite construir imagens de pequenos vasos sanguíneos e outras estruturas numa faixa de 1-2 mm abaixo da superfície, as imagens são apresentadas em esquema de cores falsas para facilitar a interpretação, para as imagens de cores claras correspondem a áreas de alta refletividade, já as de cores escuras representam baixa refletividade (FREITAS, 2007).

A OCT avaliou aparentemente uma possível irregularidade na microestrutura do tecido, analisando as amostras dos grupos por meio das imagens tomográficas de OCT em comparação com o grupo controle, não se observou grandes alterações na estrutura da pele dos grupos experimentais.

A literatura apresenta poucos estudos voltados na área e com isso houve uma dificuldade maior e limitação no desenvolvimento da metodologia. A metodologia utilizada mostrou ser viável, e de baixo custo para a realização, sendo que foi muito discutida e bem detalhada em todos os passos, é de suma importância os testes na pele de animais para adequar os parâmetros e as melhores combinações de FS com a fonte de luz escolhida para a IFDa, tendo em vista que se trata de um estudo escasso na literatura.

A coloração da pele azulada após o experimento é necessário mais testes para desempenhar um melhor resultado, sugere-se mais tempo de imersão do PBS para a pele chegar mais próximo da sua cor natural.

Os resultados obtidos são conflitantes, pois demonstram o potencial da inativação fotodinâmica e do azul de metileno isolado, para a descontaminação da pele, embora haja a necessidade de mais ensaios laboratoriais a fim de encontrar uma concentração ideal do FS azul de metileno e melhores parâmetros de luz para desempenhar uma maior inativação dos microrganismos na pele.

Sugere-se a adição de novas pesquisas no sentido de investigar diferentes concentrações do FS mais adequado, parâmetros associados a fatores de crescimento de microrganismos, como também indicadores de morte celular para determinar uma efetiva inativação dos microrganismos na pele que será destinada a transplante.

## 8 CONCLUSÃO

Foi possível demonstrar que a IFDa, e o fotossensibilizador azul de metileno isolado, apresentou possibilidades viáveis para a exploração da descontaminação da pele, podendo ser uma ferramenta relevante para os bancos de tecido. É possível afirmar que, com relação aos objetivos estabelecidos para este estudo, foi possível alcançar um maior entendimento dos efeitos da IFDa para descontaminação de pele destinadas a transplantes.

É um estudo inovador, teve como objetivo estabelecer um modelo de protocolo de baixo custo para investigação de descontaminação da pele com o uso da inativação fotodinâmica em modelo animal. A metodologia foi bem definida e detalhada, sendo possível a repetição de mais testes, e foi alcançado objetivo de estabelecer um modelo de procedimento operacional padrão para a realização de descontaminação da pele. No entanto, os resultados são promissores e um aumento nas amostras e testes complementares permitem expandir a análise em busca de evidências científicas e resultados mais contundentes.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, I. *et al.* Recent Patents on Light-Based Anti-Infective Approaches. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 13, n. 1, p. 70–88, 2018.
- ANDRADE, C.T. **Avaliação dos efeitos vasculares e teciduais em modelo animal de pele aplicando a terapia fotodinâmica combinada à radioterapia.** Tese (Doutorado em Física) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- BALTAZAR, L. M. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–11, 2015.
- BASKARAN, R.; LEE, J.; YANG, S. G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. **Biomaterials Research**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2018.
- BASU, S. *et al.* Evolution of bacterial and fungal growth media. **Bioinformation**, v. 11, n. 4, p. 182, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 55**, de 11 de dezembro de 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doação de órgãos.** Tecidos. Brasília, DF, 2017.
- BRASIL NUCLEAR. **Associação Brasileira de Energia Nuclear.** Pele nova, ano 23, n. 47, 2017. <http://www.aben.com.br/Arquivos/562/562.pdf>.
- BLISS, E. *et al.* An optimised method for the proteomic profiling of full thickness human skin. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2016.
- BOURROUL, S. C. **Caracterização dos efeitos da radiação ionizante em pele humana para aloenxerto.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- CALIXTO, G. M. F. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1–18, 2016.
- CHAKRADHAR, K. *et al.* Knowledge, attitude and practice regarding organ donation among Indian dental students. **International Journal of Organ Transplantation Medicine**, v. 7, n. 1, p. 28–35, 2016.
- CHEM, E. M. *et al.* **Banco de Tecidos Humanos. Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, 2016. Disponível em: <http://www2.cirurgiaplastica.org.br/2016/07/08/banco-de-tecidos-humanos/>. Acesso em: 04 de jun. de 2020.
- CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571–589, 2018.

- CONCEIÇÃO, R. O. *et al.* Establishment of a protocol for storage of refrigerated autologous skin. **Brazilian Journal of Plastic Surgery**, v. 32, n. 4, p. 562–569, 2017.
- COUTINHO, F. *et al.* O efeito do laser de baixa energia no crescimento bacteriano “in vitro”. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 8, p. 248–253, 2007.
- CUNDELL, A. M. Microbial Ecology of the Human Skin. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 1, p. 113–120, 2018.
- DUSE, L. *et al.* Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 126, p. 233–241, 2018.
- EDMONDS-WILSON, S. L. *et al.* Review of human hand microbiome research. **Journal of Dermatological Science**, v. 80, n. 1, p. 3–12, 2015.
- FERNANDES, M. E. N.; BITTENCOURT, Z. Z. L. C.; BOIN, I. F. S. F. Vivenciando a doação de órgãos: Sentimentos de familiares pos consentimento. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 5, p. 895–901, 2015.
- FREITAS, A. Z. **Caracterização de tecidos biológicos através de tomografia por coerência óptica**. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- FINLAY, J. C.; DARAFSHEH, A. Fontes de luz, medicamentos e dosimetria. In: **Óptica Biomédica em Otorrinolaringologia**. Springer, Nova York, NY, p. 311-336, 2016.
- GARCIA, V. D. *et al.* An overview of the current status of organ donation and transplantation in Brazil. **Transplantation**, v. 99, n. 8, p. 1535–1537, 2015.
- GONZALEZ, T. *et al.* Staphylococcal Biofilms in Atopic Dermatitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, n. 12, p. 1–20, 2017.
- HAMBLIN, M. R. To Kill Resistant Microbes. **Curr Opin Microbiolp**, v. 33, p. 67–73, 2017.
- HARRELL, C. R. *et al.* Risks of using sterilization by gamma radiation: The other side of the coin. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 274–279, 2018.
- HEIDARI, A. Future Prospects of Point Fluorescence Spectroscopy, Fluorescence Imaging and Fluorescence Endoscopy in Photodynamic Therapy (PDT) for Cancer Cells. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 08, n. 02, 2016.
- JOHNSTON, C. *et al.* Disinfection of human skin allografts in tissue banking: a systematic review report. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 4, p. 585–592, 2016.
- KESWANI, S. M. *et al.* Skin banking at a regional burns centre—The way forward. **Burns**, v. 44, n. 4, p. 870–876, 2018.

KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Skin microbiome: Looking back to move forward. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3 PART 2, p. 933–939, 2012.

KONG, H. H.; SEGRE, J. A. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Investigating the Skin Microbiome. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 5, p. e119–e122, 2017.

LIU, J. *et al.* **Comparison of Human, Porcine & Rodent Wound Healing with New Miniature Swine Study Data**. Sinclair Research, 2019. Disponível em: <https://sinclairresearch.com/scientific-posters/comparison-of-human-porcine-rodent-wound-healing-with-new-miniature-swine-study-data/>. Acesso em: 01 de jun.2020.

MARTÍNEZ-FLORES, F. *et al.* El uso clínico de aloinjertos de piel humana criopreservados con fines de trasplante. **Cirugia y Cirujanos**, v. 83, n. 6, p. 485–491, 2015.

MARTÍNEZ-FLORES, F. *et al.* Banco de piel y tejidos: un modelo operativo para la recuperación y preservación de aloinjertos de piel y tejidos. **Cirugia y Cirujanos**, v. 84, n. 1, p. 85–92, 2016.

MATIOSKI, A. *et al.* First-year experience of a new skin bank in Brazil. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 2, n. 6, p. 326, 2015.

MRÁZOVÁ, H. *et al.* Comparison of structural changes in skin and amnion tissue grafts for transplantation induced by gamma and electron beam irradiation for sterilization. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 2, p. 255–260, 2016.

MEZA, C. **Camadas da Pele**. Medium, 2018. Disponível em: <https://medium.com/@cindymeza/layers-of-the-skin-fa974368418>. Acesso em: 04 de jun. de 2020.

PABST, R. The pig as a model for immunology research. **Cell and Tissue Research**, v. 380, n. 2, p. 287–304, 2020.

PACHECO, L. Transplante de fígado no Brasil. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 43, n. 4, p. 223–224, 2016.

PRETTO, A. S. *et al.* Allogeneic skin donors from a tissue bank in Southern Brazil: clinical and epidemiological profiles and microbial colonization of skin. **International journal of dermatology**, v. 58, n. 3, p. 325-332, 2019.

REZENDE, L. B. O. *et al.* Doação de Órgãos no Brasil: Uma Análise das Campanhas Governamentais sob a Perspectiva do Marketing Social. **Revista Brasileira de Marketing**, v. 14, n. 3, p. 362–376, 2015.

RÍOS, A. *et al.* The Latin American population in Spain and organ donation. Attitude toward deceased organ donation and organ donation rates. **Transplant International**, v. 28, n. 4, p. 437–447, 2015.

RODRIGUES, K. A. *et al.* Análise de contaminantes microbiológicos em consultório odontológico. **Anais do Seminário Científico do UNIFACIG**, n. 4, 2019.

SEONG, D. Y.; KIM, Y. J. Enhanced photodynamic therapy efficacy of methylene blue-loaded calcium phosphate nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 146, p. 34–43, 2015.

SHAILESH AGARWAL, M. *et al.* Engendering Allograft Ignorance in a Mouse Model of Allogeneic Skin Transplantation to the Distal Hind Limb. **Ann Surg**, v. 261, n. 3, p. 611–618, 2015.

SHAKHOVA, M. *et al.* Photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer at 405 nm: numerical, morphological, and clinical study. **Journal of Biomedical Optics**, v. 23, n. 09, p. 1, 2018.

TAKEMOTO, A. *et al.* Molecular characterization of the skin fungal microbiome in patients with psoriasis. **Journal of Dermatology**, v. 42, n. 2, p. 166–170, 2015.

TIPPELSKIRCH, P. V. *et al.* Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in broiler chicken during slaughter in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 281, p. 82–89, 2018.

TURNER, N. J.; PEZZONE, D.; BADYLAK, S. F. Regional Variations in the Histology of Porcine Skin. **Tissue Engineering**, v. 21, n. 4, p. 1–43, 1982.

WAINWRIGHT, M. *et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e49–e55, 2017.

WALTERS, E. M. *et al.* Swine models, genomic tools and services to enhance our understanding of human health and diseases. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 167–172, 2017.

WEN, X.; LI, Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy in dermatology non-melanoma cancer: An update. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 140–152, 2017.

**ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**O uso da Terapia Fotodinâmica para descontaminação de pele de suínos**", registrada com o protocolo nº **A05/CEUA2019**, sob a responsabilidade de Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em reunião de 24 / 06 / 2019.

  
Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

Coordenadora CEUA-UNIVAP

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*  
IP&D - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova CEP 12244-000 PABX(012) 349.1000 FAX(012) 349.1252 Caixa Postal 82 S.J.Campos-SP

Email: [ceua@univap.br](mailto:ceua@univap.br)