



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

CAMPUS GAMA – FGA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Análise da microbiota cultivável de úlceras de portadores de diabetes após tratamento com biomembranas de látex natural (*Hevea Brasiliensis*) contendo curcumina concomitante ao uso do equipamento Rapha®

JOÃO MARCOS TORRES DO NASCIMENTO MENDES

ORIENTADORA: Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

CO-ORIENTADORA: Dra. Tatiana Amabile de Campos



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE UNB GAMA – FGA



**ANÁLISE DA MICROBIOTA CULTIVÁVEL DE ÚLCERAS DE PORTADORES DE
DIABETES APÓS TRATAMENTO COM BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL
(*HEVEA BRASILIENSIS*) CONTENDO CURCUMINA CONCOMITANTE AO USO DO
EQUIPAMENTO RAPHA®**

JOÃO MARCOS TORRES DO NASCIMENTO MENDES

ORIENTADORA: DRA. MARCELLA LEMOS BRETAS CARNEIRO

CO-ORIENTADORA: DRA. TATIANA AMABILE DE CAMPOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM
ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**PUBLICAÇÃO: 142A/2021
BRASÍLIA- DF, AGOSTO DE 2021**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE UNB GAMA – FGA

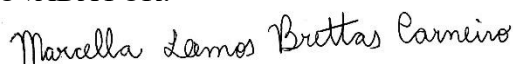
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ANÁLISE DA MICROBIOTA CULTIVÁVEL DE ÚLCERAS DE PORTADORES DE
DIABETES APÓS TRATAMENTO COM BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL
(*HEVEA BRASILIENSIS*) CONTENDO CURCUMINA CONCOMITANTE AO USO DO
EQUIPAMENTO RAPHA®**

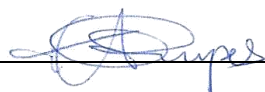
JOÃO MARCOS TORRES DO NASCIMENTO MENDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

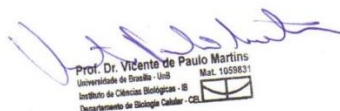
APROVADA POR:



DRA. MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO
(ORIENTADORA – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)



DRA. TATIANA AMABILE DE CAMPOS
(COORIENTADORA – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)


Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins
Universidade de Brasília - UNB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Departamento de Biologia Celular - CEL

DR. VICENTE DE PAULO MARTINS
(EXAMINADOR INTERNO – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)



DR. RONNI GERALDO GOMES DE AMORIM
(EXAMINADOR INTERNO – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

BRASÍLIA/DF, AGOSTO DE 2021

Ficha Catalográfica

TORRES MENDES, JOÃO MARCOS

Análise da microbiota cultivável de úlceras de portadores de diabetes após tratamento com biomembranas de látex natural (*Hevea Brasiliensis*) contendo curcumina concomitante ao uso do equipamento Rapha®¹ [Distrito Federal], 2021.

58p., 210 x 297 mm (FGA/UnB Gama, Mestrado em Engenharia Biomédica, 2020).

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade UnB Gama, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

- | | |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1. Microbiota | 2. LEDterapia |
| 3. Microbiologia | 4. Fitoterapia |
| 5. Úlcera de pé diabético | 6. Biomembrana de látex natural |

I. FGA/UnB

II. Título (série)

REFERÊNCIA

Torres Mendes, João Marcos (2021). Análise da microbiota cultivável de úlceras de portadores de diabetes após tratamento com biomembranas de látex natural (*Hevea Brasiliensis*) contendo curcumina concomitante ao uso do equipamento Rapha®. Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica, Publicação 142A/2021, Programa de Pós-Graduação, Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 80p.

Autor: João Marcos Torres do Nascimento Mendes

Título: Análise da microbiota cultivável de úlceras de portadores de diabetes após tratamento com biomembranas de látex natural (*Hevea Brasiliensis*) contendo curcumina concomitante ao uso do equipamento Rapha®

Grau: Mestre

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender essas cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

¹Neste trabalho, foi adotada a formatação da norma ABNT 6023/2018, utilizando o modelo do PPGEB – UnB (Programa de pós-graduação em engenharia biomédica – Universidade de Brasília).

RESUMO

A úlcera de pé diabético (UPD) representa uma das complicações mais graves da diabetes devido a alta incidência de amputação de membros inferiores associada a esta comorbidade. A úlcera suscita um ambiente propício para o desenvolvimento de infecções, visto que, além de possuir faixa de temperatura ideal no local da lesão, a presença de umidade e nutrientes pode favorecer o crescimento bacteriano. Na presença de infecção, ocorre um retardo no processo de cicatrização tecidual. Nosso grupo desenvolveu o sistema terapêutico RAPHA®, que consiste no uso concomitante de fototerapia com diodo emissor de luz (LED: Light Emitting Diode) e de curativo baseado em biomembrana de látex natural (BLN) com ou sem curcumina para tratamento da UPD. O LED foi usado no comprimento de onda vermelho. No presente estudo, foi avaliada a presença e quantidade de cepas bacterianas após tratamento. A amostra deste estudo foi composta por 15 participantes de pesquisa, portadores de UPD, distribuídos igualmente entre os grupos GC (grupo controle), GE1 (grupo experimental 1) e GE2 (grupo experimental 2). O grupo GC recebeu o tratamento padrão utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS), com troca de curativos em ambiente ambulatorial ao menos uma vez por semana. Os grupos GE1 e GE2 utilizaram curativo baseado em BLN e BLN contendo curcumina concomitante à exposição a LED durante 35 minutos. Os curativos foram trocados diariamente. Os participantes dos grupos GE1 e GE2 recebiam assistência dos pesquisadores em seus domicílios a cada quinzena e recebiam suporte e orientação da equipe diariamente por meio de diálogo no aplicativo WhatsApp. Para se avaliar a microbiota bacteriana foram coletadas amostras diretamente das úlceras dos participantes em ambiente ambulatorial (GC) e em domicílio (GE1 e GE2) a fim de identificar se os tratamentos afetavam a microbiota local. As amostras da microbiota das úlceras foram coletadas no início (D0), meio (D22) e fim do tratamento (D45). Nos respectivos dias, as amostras foram coletadas em dois momentos sendo: (1) Coleta Inicial (CI) antes de iniciar e (2) Coleta Final (CF) logo após o término do protocolo terapêutico. Para isso, utilizou-se um coletor Swab, pressionando-o levemente em sentido horário e em seu próprio eixo na área de 1 cm² da úlcera. Em seguida, as amostras foram inoculadas em um tubo, contendo meio de conservação e transporte bacteriano (Stuart). As amostras foram transportadas imediatamente para análise, sendo acondicionadas em estufa bacteriológica a 35°C (± 2°C) por 24 horas. Em seguida, realizou-se análise da microbiota utilizando-se meios de cultura Agar sangue, Agar Manitol e Agar MacConkey e meios para

provas bioquímicas Catalase e Rugai com lisina. Observou-se colonização resistente de cinco espécies bacterianas nas úlceras dos participantes dos grupos GC, GE1 e GE2 sendo: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Edwardsiella* spp. e *Klebsiella* spp. onde analisou-se a variação bacteriana entre CF e CI. Todos os participantes dos grupos experimentais tiveram contração das úlceras superior ao GC. Não se observou alterações de microbiota cultivável entre os grupos avaliados durante nos dias D0, D22 e D45. Portanto, concluiu-se que o tratamento com BLN e LED não alterou a microbiota das feridas dos participantes de pesquisa.

Palavras-chave: úlcera de pé diabético (UPD), curcumina, biomembrana de látex, fototerapia, microbiota, infecção..

ABSTRACT

Diabetic foot ulcer (DFU) represents one of the most serious complications of diabetes due to the high incidence of lower limb amputation associated with this comorbidity. The ulcer raises a favorable environment for the development of infections, due to the fact that, in addition to having an ideal temperature range at the injury site, the presence of moisture and nutrients can favor bacterial growth. In the presence of infection, there is a delay in the tissue healing process. Our group developed the RAPHA® therapeutic system, which consists of the concomitant use of phototherapy with light emitting diode (LED) and a dressing based on natural latex biomembrane (NLB) with or without curcumin for the treatment of DFU. The LED was used in the red wavelength. In the present study, the presence and amount of bacterial strains after treatment was evaluated. The sample of this study was composed of 15 research participants, with DFU, equally distributed between the groups CG (control group), EG1 (experimental group 1) and EG2 (experimental group 2). The CG group received the standard treatment used in the Unified Health System (SUS), with dressing change in an outpatient setting at least once a week. Groups EG 1 and EG 2 used dressings based on NLB and NLB containing curcumin concomitantly with exposure to LED for 35 minutes. Dressings were changed daily. Participants in groups EG 1 and EG 2 received assistance from researchers in their homes every fortnight and received support and guidance from the team daily through dialogue in the WhatsApp application. To assess the bacterial microbiota, samples were collected directly from the participants' ulcers in an outpatient setting (CG) and at home (EG 1 and EG 2) in order to identify whether the treatments affected the local microbiota. Ulcer microbiota samples were collected at the beginning (D0), middle (D22) and end of treatment (D45). On the respective days, samples were collected at two times: (1) Initial Collection (IC) before starting and (2) Final Collection (CF) right after the end of the therapeutic protocol. For this, a Swab collector was used, pressing it lightly in a clockwise direction and on its own axis in the area of 1 cm² of the ulcer. Afterwards, the samples were inoculated in a tube, containing preservation medium and bacterial transport (Stuart). The samples were immediately transported for analysis and placed in a bacteriological incubator at 35°C (± 2°C) for 24 hours. Then, microbiota analysis was performed using culture media Blood Agar, Mannitol Agar and MacConkey Agar and media for biochemical tests Catalase and Rugai with lysine. Resistant colonization of five bacterial species was observed in ulcers of participants in groups CG , EG 1 and EG 2, being: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Edwardsiella* spp. and

Klebsiella spp. where the bacterial variation between CF and CI was analyzed. All participants in the experimental groups had ulcer contraction superior to the CG. There were no changes in the cultivable microbiota between the groups evaluated during days D0, D22 and D45. Therefore, it was concluded that the treatment with NBL and LED did not change the microbiota of the wounds of the research participants.

Keywords: diabetic foot ulcer (DFU), curcumin, latex biomembrane, phototherapy, microbiota, infection.

FIGURAS

Figura 1. Ilustração da estrutura cutânea, formada por três camadas justapostas. Epiderme, derme e hipoderme Fonte: O autor, 2021 (Created with BioRender.com)..... 19

Figura 2. Estrutura da parede celular bacteriana – (A) Gram + após a membrana plasmática, há uma espessa camada de peptidoglicano entrelaçado com ácido teicóico e ácido lipoteicóico e logo após processo de coloração Gram se apresentam em tom arroxeado (B) -Gram – após a membrana plasmática, há um espaço chamado “espaço periplasmático”, uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa e logo após processo de coloração Gram se apresentam em tom avermelhado (GUERRA,2017). Fonte: O Autor,2021..... 25

Figura 3. *Staphylococcus epidermidis* - Espécie de *Staphylococcus* em formato de cocos, Gram positivas (Gram +), anaeróbio facultativo. Principalmente encontrado na pele e mucosa de animais homeotérmicos, pode ser um patógeno primário ou invasor secundário (DeCS, 2018). Fonte: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), 2011..... 26

Figura 4. *Staphylococcus aureus* - Bactéria potencialmente patogênica encontrada em membranas nasais, pele, folículos pilosos e períneo de animais homeotérmicos. Podem causar diversos tipos de infecções e intoxicações. (DeCS, 2018) Fonte: Janice Haney Carr, 2001.....27

Figura 5. *Streptococcus* spp. - Gênero de bactérias cocóides Gram positivas (Gram +) cujos organismos ocorrem em cadeias. Endosporos² não são produzidos. Várias espécies existem como comensais ou parasitas do homem e animais, sendo que algumas espécies são altamente patogênicas. Algumas espécies são saprofíticas³ e ocorrem no ambiente natural (DeCS, 2015). Fonte: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID,2019.....27

Figura 6. *Peptostreptococcus* spp. Gênero de bactérias cocóides, Gram positivas (Gram +) e anaeróbias, que são parte da microbiota normal de humanos. Seus organismos são patógenos oportunistas, causando bacteremias e infecções de tecido mole (DeCS, 2015). Fonte: Van Dalen,1993.....28

Figura 7. - *Escherichia coli* - Espécie de bactéria Gram negativa (Gram –), facultativamente anaeróbia, em forma de bastão comumente encontrada na parte mais baixa do intestino de animais de sangue quente. Geralmente não é patogênica, embora algumas linhagens sejam conhecidas por produzir diarreia e infecções pirogênicas. As linhagens patogênicas são classificadas pelos seus mecanismos patogênicos específicos como toxinas (DeCS, 2009). Fonte: Arek Socha, 2018.....29

Figura 8. *Pseudomonas aeruginosa* - Espécie de bactérias em bastonete, Gram negativa (Gram –) e aeróbias, comumente isoladas de amostras clínicas (feridas, queimaduras e infecções do trato urinário). Também é amplamente distribuída no solo e na água. *P. aeruginosa* é um dos principais agentes de infecção hospitalar. (DeCS, 2009).Fonte: Jomar Junior, 2017..... 29

² Grupo de cocos cujas relações taxonômicas são incertas. Formam endosporos, têm corpos de parede espessa no interior de células vegetativas de certas bactérias, e são capazes de passar por condições ambientais adversas por períodos prolongados (DeCS,2009).

³ Organismo que obtém seus nutrientes de matéria orgânica em decomposição (MICHAELIS,2021).

- Figura 9.** *Morganella morganii* - Espécie de *Morganella* previamente classificada como espécie de *Proteus*. É encontrada em fezes de humanos, cães, outros mamíferos e répteis. (DeCS,2009). Fonte: KUNG, 202030
- Figura 10.** *Proteus mirabilis* - Espécie bacteriana Gram negativa (Gram –), facultativamente anaeróbia e em forma de bastonete, que é frequentemente isolada de amostras clínicas. O local mais comum de infecção é o trato urinário (DeCS, 2009).Fonte: Kreisleriana, 2020..... 31
- Figura 11.** *Klebsiella* spp - Gênero de bactérias Gram negativa (Gram –), facultativamente anaeróbias e em forma de bastonete, cujos organismos se arranjam individualmente, aos pares ou em cadeias curtas. Este gênero é comumente encontrado no trato intestinal e é um patógeno oportunista que pode levar a septicemia, pneumonia, infecções do trato urinário e outros tipos de infecção humana (DeCS,2009) Fonte: Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas, National Institutes of Health, 2020.....32
- Figura 12.** *Edwardsiella* spp. - Gênero bacteriano em forma de bastonetes, Gram negativa (Gram –), anaeróbios facultativos, geralmente com motilidade devido aos flagelos. Membros deste gênero geralmente são encontrados nos intestinos de animais de sangue frio e em água doce (DeCS, 2009). Fonte: O autor, 2021 (Created with BioRender.com).....33
- Figura 13.** (A) *Curcuma longa* em Rizoma e em pó Fonte: EUGSTER,2014 e (B) Estrutura química do principal curcuminoide da *Curcuma longa*, a Curcumina. Fonte: AKBIK,2014... 39
- Figura 14.** Lipossomas. - São vesículas compostas por bicamadas lipídicas fechadas, amplamente empregadas como veículos para entrega de fármacos por possibilitar o carregamento de moléculas imiscíveis em água tais como curcumina na região lipofílica. Possibilitando ainda carregamento de outro fármaco hidrossolúvel na região hidrofílica. Fonte: Adaptado de SILVA, 2020.41
- Figura 15.** Biomembrana de látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* vulcanizado e veiculado com lipossomas de curcumina. Fonte: O autor, 2020. 43
- Figura 16.** Equipamento de neoformação tecidual com LED de alta potência com comprimento de onda entre 635 e 640 nm (luz vermelha) RAPHA®. Fonte: O autor, 2020..... 44
- Figura 17.** Desenho experimental do estudo – Grupos de avaliação: (1) grupo controle (GC), (2) grupo experimental 1 (GE1) e (3) grupo experimental 2 (GE2). Cada grupo composto por cinco participantes. É demonstrado no fluxograma o tipo de tratamento realizado, local de tratamento e periodicidade de troca do curativo. Fonte: O autor, 2020..... 46
- Figura 18.** Aplicação do protocolo experimental. A) Úlcera diabética após limpeza com soro fisiológico 0,9%. B) Biomembrana de látex cortada e colocada sobre a úlcera conforme tamanho da ferida. C) Aplicação do protocolo experimental utilizando biomembrana de látex e LEDterapia. D) Curativo finalizado utilizando a biomembrana de látex como cobertura primária e fechado com gaze e atadura. Fonte: Santana, 2021. 46
- Figura 19.** Swab e meio de transporte STUART estéril – haste plástica flexível denominada Swab utilizada para coletas de materiais biológicos em UPD acompanhado de meio de transporte STUART não seletivo para manutenção da viabilidade microbiológica durante o traslado para o laboratório. Fonte: O autor, 2020.47

Figura 20. – Prova da catalase – Fluxograma para identificação diferencial de bactérias Gram +. Fonte: Adaptado de BRASIL,2004.	49
Figura 21. – Prova da catalase – A) reação positiva: evidentes por efervescência imediata (O ₂ + água = bolhas). B) reação negativa, sem formação de bolhas.	50
Figura 22. – Tubo Rugai com lisina – meio de cultura utilizado para identificar família <i>Enterobacteriaceae</i> . Apresentação das porções onde ocorrem as reações bioquímicas.	50
Figura 23. – Resultados visuais do meio de cultura Rugai com lisina – representação dos resultados esperados para identificação de bactérias.	51
Figura 24. Prevalência geral de bactérias Gram + versus bactérias Gram -: amostras bacterianas coletadas diretamente da úlcera dos participantes de pesquisa dos seguintes grupos: grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2), durante os dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22) e D45 (Dia 45) de tratamento.	52
Figura 25. – Prevalência de espécies microbianas: amostras bacterianas coletadas diretamente da UPD dos participantes de pesquisa dos seguintes grupos: grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2), durante os dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22) e D45 (Dia 45) de tratamento	53
Figura 26. – Registro fotográfico dos dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22), e D45 (Dia 45) do representante do grupo controle (GC).	54
Figura 27. – Registro fotográfico dos dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22), e D45 (Dia 45) da representante do grupo experimental 1 (GE1) tratado com biomembrana de látex natural (BLN) + LED (RAPHA®).	54
Figura 28. – Registro fotográfico dos dias D0 (Dia 0), D17 (Dia 17), e D33 (Dia 33) da representante do grupo experimental 2 (GE2) tratado com biomembrana de látex natural (BLN) veiculada com lipossomas de curcumina + LED (RAPHA® Plus).	55
Figura 29 – Variação bacteriana entre a Coleta Inicial (CI) - ao retirar o curativo e antes de iniciar os protocolos (1) padrão do SUS (GC), (2) protocolo RAPHA® (GE1) e (3) protocolo RAPHA® Plus (GE2) e a Coleta Final (CF) - logo após ao término desses procedimentos e antes do fechamento do novo curativo do dia inicial D0 (A), dia intermediário D22 (B) e do dia derradeiro D45 (C) - os números representados nas colunas % de Variação e % MÉDIA quando se apresentam negativos demonstram diminuição da microbiota após os devidos protocolos e serão apresentados em fonte vermelha. Os números positivos evidenciam um aumento na microbiota da UPD e os números permanecem em fonte preto automático.....	56
Figura 30 – Números absolutos da contagem microbiana (tendo como unidade de medida UFC/mL) global dos participantes de pesquisa alocadas nos grupos Grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2) nos dias D0, D22 e D45. Amostras coletadas em dois momentos: (1) Coleta Inicial (CI) ao retirar o curativo e antes de iniciar os protocolos e (2) Coleta Final (CF) logo após ao término desses procedimentos e antes do fechamento do novo curativo.	58
Figura 31. – Resultado das amostras coletadas no dia D0 por grupo. (A) Coleta Inicial (CI) e (B) Coleta Final (CF) no dia 0. Grupo Controle (GC) seguindo o tratamento SUS, Grupo Experimental 1 (GE1) com tratamento RAPHA® e Grupo Experimental 2 (GE2) tratamento RAPHA® Plus. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon para amostras dependentes, o resultado de significância apresentado foi de p-valor	

0,156. Demonstrando, portanto, que não há diferença significativa..... 59

Figura 32 – Resultado das amostras coletadas no dia D22 por grupo. (A) Coleta Inicial (CI) e (B) Coleta Final (CF) no dia 0. Grupo Controle (GC) seguindo o tratamento SUS, Grupo Experimental 1 (GE1) com tratamento RAPHA® e Grupo Experimental 2 (GE2) tratamento RAPHA® Plus. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon para amostras dependentes, o resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,053. Demonstrando, portanto, que não há diferença significativa..... 60

Figura 33– Resultado das amostras coletadas no dia D45 por grupo. (A) Coleta Inicial (CI) e (B) Coleta Final (CF) no dia 0. Grupo Controle (GC) seguindo o tratamento SUS, Grupo Experimental 1 (GE1) com tratamento RAPHA® e Grupo Experimental 2 (GE2) tratamento RAPHA® Plus. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon para amostras dependentes, o resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,125. Demonstrando, portanto, que não há diferença significativa..... 60

Figura 34 - Gráfico de barras onde é apresentado quantitativamente as UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL) entre a Coleta Inicial (CI) - ao retirar o curativo e antes de iniciar os protocolos (1) padrão do SUS (GC), (2) protocolo RAPHA® (GE1) e (3) protocolo RAPHA® Plus (GE2) e a Coleta Final (CF) - logo após ao término desses procedimentos e antes do fechamento do novo curativo nos dias experimentais D0, D22 e D45. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada pela análise de variância ANOVA, o resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,9119. Demonstrando, pois, que não há diferença significativa..... 61

QUADROS

Quadro 1. Coberturas utilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no tratamento das feridas cutâneas.34

Quadro 2. Meios de cultura e provas bioquímicas para identificação microbológica. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2004. 48

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
FIGURAS	9
QUADROS.....	133
INTRODUÇÃO	17
1.1 Diabetes mellitus e complicações	18
1.2 Tecido cutâneo e sua microbiota.....	20
1.2.1 Diferenciação bacteriana – coloração de GRAM	25
1.2.2 Bactérias Gram Positivas (GRAM +)	26
1.2.3 Bactérias Gram Negativas (GRAM -).....	29
1.3 ABORDAGEM TERAPÊUTICA - SUS.....	33
1.4.1 ABORDAGEM TERAPÊUTICA – BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL (BLN).....	35
1.4.2 ABORDAGEM TERAPÊUTICA – FOTOTERAPIA	36
1.5 ABORDAGEM TERAPÊUTICA – <i>Curcuma longa</i> e CURCUMINA	38
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL	42
3.2 Dispositivo RAPHA®	43
3.3 CONDUTA EXPERIMENTAL COM OS PARTICIPANTES	44
3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	47
4. RESULTADOS	52

4.1 relação da EVOLUÇÃO DAS FERIDAS e MICROBIOTA	52
4.2 ANÁLISE DE DADOS	57
4.2.1 Padronização das amostras de acordo com a classificação da universidade de Texas.	61
5. Discussão	62
6. CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS	64
7. REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1 - Classificação de feridas da Universidade do Texas	75
ANEXO 2 - Parecer Consubstanciado Do CEP	76
ANEXO 3 – Laudo de esterilização da BLN	77
APÊNDICE A - Tabela de resultados da análise ANOVA. Significância atribuída a p-valor <0,05. O resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,9119. Demonstrando, portanto, que não há diferença significativa.	788
APÊNDICE B - Tabela de Sumarização de Teste de Hipótese, não-paramétrico, de amostras relacionadas de Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon.....	799
APÊNDICE C - Tabela de Variação bacteriana entre a Coleta Inicial (CI) e a Coleta Final (CF). os números representados nas colunas quando se apresentam negativos demonstram diminuição da microbiota após os devidos protocolos e serão apresentados em fonte vermelha. Os números positivos evidenciam um aumento na microbiota da UPD e os números permanecem em fonte preto automático.	80

LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIações

A/O	Água em Óleo
ATP	Adenosina Trifosfato
BLN	Biomembrana de Látex Natural
CAEE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê De Ética Humano
CF	Coleta Final
CI	Coleta Inicial
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAP	Doença Arterial Periférica
DM	Diabetes Mellitus
GAS	Produção De Gás
GLI	Fermentação Da Glicose
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido De Hidrogênio
H₂S	Produção De Sulfeto De Hidrogênio
HRAN	Hospital Regional da Asa Norte
HRC	Hospital Regional de Ceilândia
IB – UnB	Instituto de Biologia da Universidade de Brasília
IND	Reação De Indol
ITU	Infecção Do Trato Urinário
J/cm²	Joule Por Centímetro Quadrado
LAMP	Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos da Universidade de Brasília
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	Light Emitting Diode
LEI – UnB	Laboratório de Engenharia e Inovação da Universidade de Brasília
LIS	Descarboxilação Da Lisina
LTD	Desaminação Do Aminoácido L-Triptofano
mL	Mililitro
MOT	Motilidade
MW	Megawatt
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
O₂	Oxigênio
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAPHA®	Dispositivo para neoformação tecidual associada com biomembranas de látex
SAC	Fermentação Da Sacarose
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UnB	Universidade de Brasília
UPD	Úlcera de Pé Diabético
UPD	Úlcera De Pé Diabético
URE	Hidrólise Da Ureia
VBTF	Vapor De Baixa Temperatura e Formaldeído
µL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS E COMPLICAÇÕES

A Diabetes mellitus (DM) consiste em um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela desordem na produção ou ação da insulina ou ambos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005; ALAM *et al.*, 2014). Outrossim, ela é um dos maiores problemas de saúde global, estimando-se que o número de pacientes com a doença aumentará cerca de 425 milhões em 2017 para 629 milhões em 2045, em pessoas entre 20 e 70 anos. Em longo prazo, dentre as complicações da diabetes tem-se o risco de desenvolver úlceras nos pés (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005).

A úlcera do pé diabético (UPD) é uma importante causa de morbidade, apresentando-se como motivo de grande parte da internação de pacientes com DM. Essa moléstia é responsável por um alto índice de amputação dos membros inferiores (YAZDANPANA, 2015), visto que a cicatrização da ferida é prejudicada em decorrência da inflamação prolongada (BALZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014). A UPD é avaliada segundo a classificação de feridas da Universidade do Texas (Anexo 1), pois oferece informações clínicas das úlceras que têm suas apresentações subdivididas em graus e estágios relacionados, sendo considerados profundidade, infecção e isquemia na lesão. Os graus dessa classificação vão aumentando conforme a gravidade da lesão. Feridas superficiais, por exemplo, enquadram-se no grau 1. Já quando há comprometimento de pele e tecido subcutâneo, a classificação é de grau 2 e, quando a lesão se estende para tendão ou cápsula, é classificada como grau 3 (GODOY-SANTOS, 2017).

A inflamação persistente pode ser agravada devido à presença de tecido necrótico, corpos estranhos, contaminação bacteriana, pois leva à perturbação do equilíbrio entre fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (LAUREANO, 2011). Esses fatores pró-inflamatórios fazem parte da nossa imunidade inata, ativando o metabolismo do ácido araquidônico⁴ que, conseqüentemente, libera prostaglandinas⁵ e leucotrienos⁶, aumentando a permeabilidade

⁴ Ácido graxo essencial liberado da membrana plasmática por ação da enzima fosfolipase A2, ativando uma cascata metabólica que inicia pela ação da prostaglandina. (MENDES,2012)

⁵ Mediador inflamatório (MENDES,2012)

⁶ Mediador inflamatório (LIMA,2002)

vascular e do fluxo sanguíneo para facilitar a migração dos leucócitos e o extravasamento de proteínas plasmáticas, agindo contra os patógenos (FREITAS, 2019).

A cicatrização de feridas depende de diversos processos de sinalização celular, que ocorrem de maneira ordenada e eficiente. Ela é caracterizada por hemostasia⁷, inflamação, proliferação celular e remodelação da matriz extracelular (DIEGELMANN; EVANS, 2004). No entanto, essa progressão é prejudicada em feridas crônicas, como as UPDs. Além disso, há diversos fatores como trauma repetido ou estresse mecânico aplicado ao pé e à própria hiperglicemia, que desencadeia um processo anormal de inflamação (TSOURDI *et al.*, 2013).

A cronificação da etapa inflamatória pode ser causada pela hiperglicemia, afetando a cicatrização, pois induz, de forma indireta, a síntese de colágeno. Essa desordem metabólica pode alterar a morfologia e diminuir a proliferação celular, além de provocar a diferenciação anormal de queratinócitos⁸, células importantes para promoção da regeneração tecidual. Ademais, na UPD, o processo de cicatrização é prejudicado em decorrência de alterações na biodisponibilidade de moléculas pró-inflamatórias como citocinas⁹ e fatores de crescimento, os quais implicam na desregulação da proliferação, diferenciação, migração e metabolismo celular (TSOURDI *et al.*, 2013).

A hiperglicemia prolongada é o elo comum que une os três pilares responsáveis pela formação da úlcera no pé dos diabéticos: isquemia, neuropatia e infecção. Isquemia é a causa da suspensão ou cessamento da irrigação sanguínea nos membros inferiores, conhecida como doença arterial periférica (DAP). O estado isquêmico é causado frequentemente pela formação de placas de gordura diminuindo o calibre das paredes arteriais, conhecida como aterosclerose (FERREIRA, 2010). Já a neuropatia é responsável pelo bloqueio da sudorese, diminuição da oxigenação local e sensibilidade permitindo o desenvolvimento de lesões graves, além de atrofia muscular, gerando assim pontos de pressão exacerbada na região podal.

Por fim, infecção é o conjunto de condições que proporcionam elevação da temperatura e edema do pé, gerando desidratação da pele, o que favorece a formação de fissuras. Além disso, a infecção promove ambiente ideal para colonização e replicação bacteriana, sobretudo

⁷ Manutenção da integridade dos vasos sanguíneos evitando a perda excessiva de sangue (VIEIRA, 2007)

⁸ Células epidérmicas que sintetizam queratina, e que passam por transformações características durante sua movimentação em direção à superfície, saindo das camadas basais da epiderme até a camada córnea da pele (DeCS, 2006).

⁹ Proteínas secretadas por leucócitos inflamatórios e por células não leucocitárias que agem como mediadores intercelulares (DeCS, 2018).

em indivíduos com controle metabólico descompensado, visto que apresentam a imunidade inata¹⁰ reduzida (NEVES, 2013).

1.2 TECIDO CUTÂNEO E SUA MICROBIOTA

A pele (Figura 1) é o maior órgão do corpo humano. Ela possui como principal função isolar as estruturas internas do ambiente externo, formada por três camadas justapostas: epiderme, derme e hipoderme. A camada mais externa da pele é a epiderme, sendo avascular e tem como função principal a proteção contra agentes externos. Constituída de células epiteliais achatadas sobrepostas que, as considerando de dentro para fora, estão dispostas em; camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e sua camada mais externa o estrato córneo (THIERS, 2005).

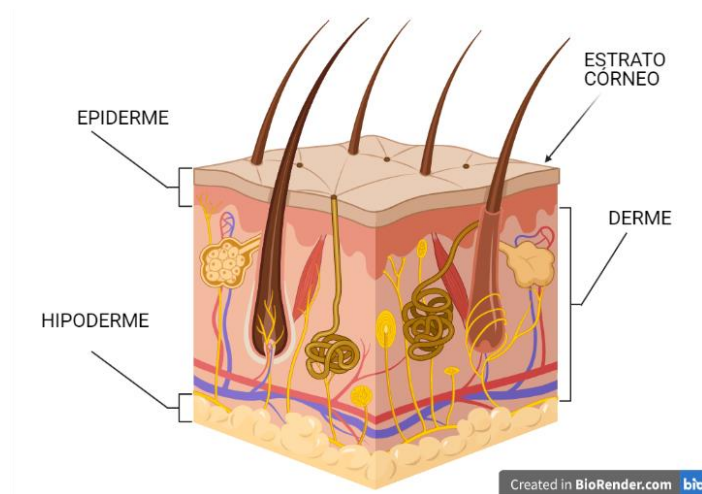


Figura 1. Ilustração da estrutura cutânea, formada por três camadas justapostas. Epiderme, derme e hipoderme
Fonte: O autor, 2021 (Created with BioRender.com)

Na superfície da pele, o estrato córneo é coberto por um filme responsável por sua aparência flexível e consistente, formada por uma emulsão do tipo A/O (água em óleo). Sua constituição é feita à base de proteína que é hidrossolúvel e lipossolúvel. A parte hidrossolúvel é formada por suor (íons, ureias liberadas pelas glândulas sudoríparas) e a parte lipossolúvel é formada por sebo (glicerídeos e ácidos graxos das glândulas sebáceas). A emulsão A/O é

¹⁰ Capacidade de um organismo normal permanecer não infectado por microrganismos e suas toxinas (DeCS, 2016)

absorvida na camada córnea e participa da formação de uma barreira cutânea, formando assim uma rede compacta responsável pelo "efeito barreira" (THIERS, 2005).

A pele é um ambiente inóspito que se caracteriza por extensas regiões ressecadas, pH ácido, rotatividade contínua de suas células superficiais e produção de proteases¹¹, lisozimas¹² e peptídeos antimicrobianos. Apesar desses mecanismos de proteção, os microrganismos¹³ sobrevivem e se espalham para os anexos da pele¹⁴ em uma simbiose¹⁵, onde o hospedeiro pode se beneficiar de diferentes maneiras, incluindo a proteção contra a colonização e subsequentes infecções (PATIÑO, 2013).

A título de exemplo, *Staphylococcus aureus* é um patógeno comum, estando presente em cerca de 20 a 30% de indivíduos saudáveis sejam portadores nasais assintomáticos¹⁶, conquanto essa colonização também possa causar infecções localizadas e sistêmicas. Algumas linhagens de *Staphylococcus epidermidis* e *Corynebacterium* spp. podem inibir ou reverter a colonização nasal por *S. aureus*, estabelecendo uma relação de mutualismo¹⁷ com o hospedeiro, o que significa que não são prejudiciais e pode representar um benefício salutar (PATIÑO, 2013).

A eliminação de *S. epidermidis* devido ao uso irracional de antibióticos pode ser prejudicial para o hospedeiro. Isso ocorre porque uma grande quantidade de peptídeos antimicrobianos permite patógenos em potenciais oportunistas e que colonizam a pele com maior eficiência (PATIÑO, 2013).

Além disso, na ausência de bactérias comensais da pele, o hospedeiro pode ser menos eficiente em sua resposta imunológica. Outra mudança na composição de bactérias, que ocorre com frequência, deve-se ao uso de sabonetes e antissépticos nas mãos. Visto que diferentes espécies de bactérias são modificadas dependendo da frequência de lavagem das mãos. Em particular, destacam-se bactérias *Propionibacterium*, *Neisseria*, *Burkholderiales* e

¹¹ Enzima que especificamente clivam as ligações peptídicas encontradas em proteínas e peptídeos (DeCS,2004).

¹² Enzima básica que está presente na saliva, lágrimas, clara de ovo e muitos fluidos animais. Funciona como agente antibacteriano (DeCS,2003).

¹³ Fungos e bactérias (AZEVEDO,1998)

¹⁴ Unhas, pelos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (GONÇALVES,2017)

¹⁵ Relação entre duas espécies diferentes de organismos que são interdependentes; uma ganha benefícios da outra ou uma relação entre diferentes espécies em que ambos os organismos em questão se beneficiam da presença do outro. (DeCS,2016).

¹⁶ Estado de se abrigar um organismo infeccioso sem manifestar sintomas de infecção (DeCS,2016).

¹⁷ Associação entre dois seres vivos, na qual ambos são beneficiados, resultando em dependência mútua. (DeCS,2016).

Pasteurellaceae, que são relativamente mais abundantes quando o tempo decorrido desde a última lavagem é superior a quatro horas. Por outro lado, outras bactérias nos grupos *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* e *Lactobacillaceae* apresentam o padrão oposto e são relativamente mais abundantes nas mãos recém-lavadas. Embora a lavagem das mãos altere a composição, isso não afeta as concentrações globais de diversidade bacteriana *in loco*, nem elimina a maioria das bactérias encontradas na superfície da pele (PATIÑO, 2013).

Existe uma associação entre aumento da umidade, pH, uso de produtos oclusivos¹⁸ e colonização por bacilos Gram negativos e bactérias coliformes. Essas alterações aumentam o número de bactérias em 10.000 vezes, além de haver um maior isolamento de fungos. Simples ações como mudar as condições físicas e regular a umidade e a temperatura, além de promover o crescimento da microbiota bacteriana comensal promovem, ainda, um declínio da microbiota patogênica, principalmente de *S. aureus* (PATIÑO, 2013).

O estudo realizado por Canesso (2014, p.76) sugere que o reparo de feridas cutâneas é acelerado e sem cicatriz na ausência da microbiota comensal¹⁹, devido a um processo inflamatório controlado. Ele ainda ressalta a importância de entender como a microbiota comensal regula o processo de cicatrização, proporcionando novas direções, não apenas para o entendimento da fisiopatologia de feridas, mas também pode apoiar novas estratégias para tratar feridas através da manipulação da microbiota.

Os microrganismos têm sido essenciais na evolução da vida dos vertebrados convivendo em uma relação de simbiose e colonizando tecido cutâneo, trato gastrointestinal, respiratório e vaginal. A relação comensal entre a comunidade microbiana e seu hospedeiro eucarioto tem demonstrado, atualmente, uma forte interação que vai além de uma simples relação física e que permite uma variedade de benefícios fisiológicos como defesa contra a colonização de patógenos oportunistas²⁰, suplementação de nutrientes essenciais, metabolismo de composto não-digestíveis, composição da microbiota intestinal, e principalmente, na regulação do sistema imune (CANESSO, 2014; NASCIMENTO, 2010).

¹⁸ Bloqueio total ou parcial da circulação de sólidos ou líquidos pelos canais ou vasos do organismo, por exemplo a pele (MICHAELIS, 2021).

¹⁹ Relação entre diferentes espécies em que ambos os organismos em questão se beneficiam da presença do outro. (DeCS, 2016).

²⁰ Infecção causada por um organismo que se torna patogênico sob certas situações como, por exemplo, durante imunossupressão. (DeCS, 1988).

A microbiota da pele íntegra humana é estabelecida já em seu nascimento, dependendo inclusive do tipo de parto, pois os nascidos via vaginal apresentam inicialmente colonização de *Lactobacillus* spp, enquanto os nascidos de cesárea são colonizados por microrganismos ambientais e hospitalares comuns, como *Staphylococcus*, *Streptococcus* ou *Propionibacterium* (NETO,2020).

Os *Lactobacillus* spp. são bactérias produtoras do ácido lático. Portanto, este tipo de bactéria leva à redução do pH do tecido cutâneo injuriado, dificultando assim, a colonização de patógenos oportunistas, incluindo os formadores de biofilme²¹. Além disso, essa espécie microbiana expressa a quimiocina CXCL12²², responsável por acelerar o fechamento e a melhora da ferida em camundongos com hiperglicemia ou isquemia periférica, condições associadas a feridas crônicas (GUYON, 2014).

Destaca-se, ainda, que a presença de infecção na lesão não é a causa e sim uma consequência da ocorrência da úlcera. Os principais microrganismos isolados em UPD incluem *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, bacteroides do grupo fragilis, Bacilos Gram + e *Peptostreptococcus*. Porém, a espécie mais habitual em úlceras é *Staphylococcus aureus* (NOOR, 2015; CARVALHO *et al*, 2004).

Todas as úlceras podológicas albergam microrganismos, porém infecções no Pé Diabético são superficiais, isto é, elas não se estendem para além da fáscia subcutânea²³. No entanto, a colonização de lesões por bactérias não é equivalente a uma infecção. A infecção é definida como a proliferação de agentes microbianos patogênicos numa lesão e quando a contagem de microrganismos supera 10⁵ UFC/mL, causando danos teciduais e desencadeamento de uma resposta inflamatória no hospedeiro (LEITE,2011).

Os sinais clássicos de infecção em feridas incluem calor, exsudação²⁴ purulenta, hiperemia, dor e edema. Além do atraso na cicatrização, observa-se, nas lesões infectadas, presença de friabilidade do tecido de granulação com pigmentações e despigmentações patológicas, ausência de tecido de granulação no leito ou presença de tecido anormal, alteração

²¹ Incrustações, formadas por bactérias mergulhadas em matriz extracelular de substância polimérica secretada pelos microrganismos (DeCS, 2018).

²² Quimiocina CXC quimiotática para Linfócitos T e Monócito, além de estar envolvido na progressão da angiogênese. são produzidas pelo processamento alternativo de RNAm (DeCS,2016; GUYON, 2014)

²³ Camada de tecido conjuntivo de espessura variável. Encontra-se imediatamente abaixo da pele (DeCS,2003)

²⁴ Produto soroso de alto teor proteico resultante de processo inflamatório, que sai dos vasos sanguíneos e se deposita em superfícies teciduais (MICHAELIS,2021).

no odor, deterioração e reabertura da ferida, maceração, inflamação e celulite, desconforto ou aumento da dor na região da lesão e formação de abscesso²⁵ (QUEGE, 2008).

A infecção ocorre quando há presença e replicação de microrganismos na região da ferida. Este fator é influenciado pela presença de tipos de microrganismos. Ainda, podem-se citar os fatores de resistência dos microrganismos patogênicos, os quais afetam as condições gerais de perfusão de nutrientes e da oxigenação dos tecidos. Com isso, pode ocorrer a cronificação da lesão de forma direta e indireta. O mecanismo direto inclui basicamente produção de toxinas que induzem um aumento da quantidade de moléculas pró-inflamatórias (citocinas) e a necrose tecidual. Além disso, as bactérias também induzem redução de mecanismos protetores quimiotáticos, aumentam a produção de enzimas citotóxicas e de radicais livres e, ainda, acentuam a hipóxia²⁶, que é exacerbada pelos metabólitos vasoconstritores. Todos esses fatores, ocasionados pela presença de microrganismos, levam à lesão tecidual (QUEGE, 2008).

Desta forma, a ocorrência de infecção em feridas de indivíduos diabéticos leva ao aumento de custos tanto na assistência ambulatorial como para o paciente sob cuidados em domicílio. Além disso, o uso empírico²⁷ de antibióticos na terapêutica da UPD desencadeia efeitos adversos e resistência bacteriana, dificultando ainda mais o tratamento (QUEGE, 2008).

A terapêutica antibiótica inicial na UPD é empírica e apoiada na severidade da infecção, em indicações epidemiológicas e evidências clínicas. O tratamento antibiótico definitivo é baseado na resposta clínica do paciente à antibioticoterapia empírica, assim como também nos resultados culturais e da sensibilidade aos antibióticos dos agentes patogênicos isolados. O aumento de bactérias resistentes a antibióticos dificulta a escolha de medicamentos para o tratamento de infecções em úlceras diabéticas. Dessa forma, a cronicidade das lesões, associada a múltiplos internamentos hospitalares, consultas frequentes e esquemas de antibioticoterapia prolongada, são responsáveis por este aumento (LEITE, 2011).

²⁵ Acumulação de pus em uma cavidade existente ou formada acidentalmente nos tecidos, em consequência de inflamação (MICHAELIS,2021).

²⁶ Situação em que o conteúdo de oxigênio no nível celular encontra-se diminuído. (DeCS,2016)

²⁷ Que se baseia somente na experiência ou observação, ou por elas se guia, sem levar em consideração teorias ou métodos científicos; experimental, prático (MICHAELIS,2021).

1.2.1 DIFERENCIAÇÃO BACTERIANA – COLORAÇÃO DE GRAM

Em 1884, a coloração de Gram foi desenvolvida pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram. Ela é um dos procedimentos mais úteis para diferenciação das bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas (Gram +) e Gram negativas (Gram –). Assim sendo, é o método de coloração diferencial mais utilizado em exames diretos ao microscópio de amostras clínicas e de colônias bacterianas.

As bactérias Gram + (Figura 2A) possuem espessa camada de Peptidoglicano²⁸, conferindo rigidez, regulação de nutrientes, regulação da divisão celular e proteção. Elas retêm o corante primário (cristal violeta) devido ao aumento na quantidade de ácido teicóico e a diminuição da permeabilidade na parede celular aos solventes orgânicos, por conterem menos lipídeos e maior quantidade de Peptidoglicano na parede celular (CAMPANHÃ, 2000; PEREIRA, 2011).

A parede das bactérias Gram – (Figura 2B), por outro lado, apresenta maior complexidade estrutural. Sobre a membrana citoplasmática há uma fina camada de peptídeoglicano e, acima desta, há uma membrana composta de bicamada fosfolipídica (denominada de membrana externa) contendo alta concentração de lipopolissacarídeo (LPS), em sua face extracelular. Entre as duas membranas (citoplasmática e externa), há um espaço abrangendo o peptídeoglicano denominado de periplasma. O espaço periplasmático é rico em enzimas e proteínas possuindo grande atividade biológica. Na coloração de Gram, a delgada camada de peptídeoglicano não permite a fixação do corante cristal violeta e iodo. Por esta razão, o corante é removido na lavagem com etanol. A remoção permite então a contra-coloração com a fucsina. Estas células bacterianas, então, são visualizadas em tom avermelhado, distintamente das Gram + que ficam coradas em tom arroxeado (CAMPANHÃ, 2000; PEREIRA, 2011).

²⁸ Polímero estrutural do envelope da célula bacteriana que consiste em açúcares e aminoácidos, o qual é responsável tanto pela determinação da forma como pela integridade celular sob estresse osmótico em virtualmente todas as bactérias (DeCS,2017).

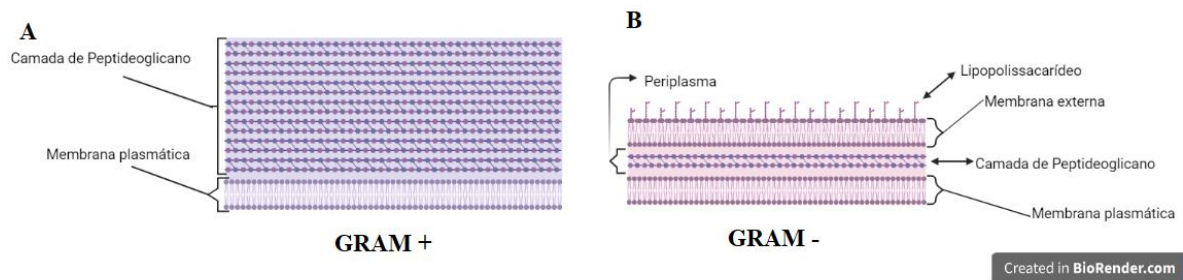


Figura 2. Estrutura da parede celular bacteriana – (A) Gram + após a membrana plasmática, há uma espessa camada de peptidoglicano entrelaçado com ácido teicóico e ácido lipoteicóico e logo após processo de coloração Gram se apresentam em tom arroxeado (B) -Gram – após a membrana plasmática, há um espaço chamado “espaço periplasmático”, uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa e logo após processo de coloração Gram se apresentam em tom avermelhado (GUERRA,2017). Fonte: O Autor,2021

1.2.2 BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS (GRAM +)

O *Staphylococcus epidermidis* (Figura 3) é um colonizador bacteriano comensal da pele e membranas mucosas de humanos. Possui um polissacarídeo B específico e dificilmente causa danos aos queratinócitos, produzindo peptídeos tóxicos para outros microrganismos, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus*. A epiderme permite o crescimento de *S. epidermidis*, enquanto isso fornece ao hospedeiro um nível adicional de peptídeos antibacterianos, constituindo uma relação perfeita de mutualismo hospedeiro-bactéria.

Entretanto, também é visto como um importante patógeno oportunista, juntamente com *Staphylococcus aureus*. *S. Epidermidis*, ocupa o primeiro lugar entre os causadores agentes de infecções hospitalares. Os custos de septicemia causados por contaminação de cateter vascular pelo *S. epidermidis* chegam a aproximadamente US\$ 2 bilhões anuais para os Estados Unidos da América, pelas dificuldades de tratamento causadas por resistência bacteriana (OTTO, 2009; PATIÑO, 2013).

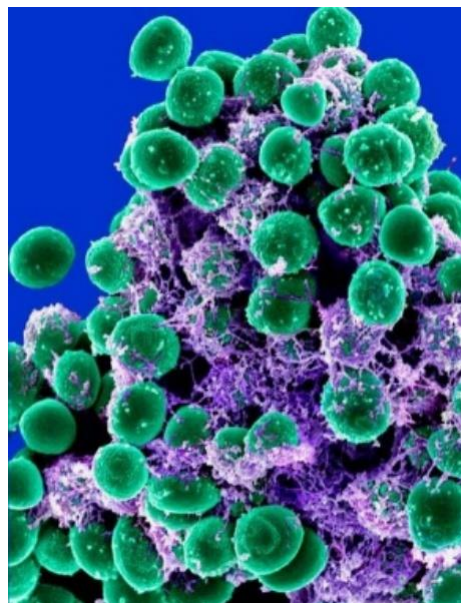


Figura 3. *Staphylococcus epidermidis* - Espécie de *Staphylococcus* em formato de cocos, Gram positivas (Gram +), anaeróbio facultativo. Principalmente encontrado na pele e mucosa de animais homeotérmicos, pode ser um patógeno primário ou invasor secundário (DeCS, 2018). Fonte: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), 2011

Staphylococcus aureus é a bactéria mais comum em infecções nosocomiais³² causando diversas doenças, variando de pequenas infecções de pele a condições de risco de vida, incluindo endocardite e septicemia. Apesar dessas capacidades patogênicas, estafilococos fazem parte da microbiota normal da pele e suas interações com os humanos são normalmente assintomáticos. As infecções causadas por esse agente geralmente resultam nas violações da imunidade inata do hospedeiro como danos às membranas mucosas e cutâneas. Com o avanço da biotecnologia, foram sequenciados genomas de *Staphylococcus*, revelando que *S. aureus* (Figura 4) e *S. epidermidis* compartilham um conjunto básico comum de genes. Contudo *S. aureus* é mais eficiente do que *S. epidermidis* na aquisição e incorporação de DNA estranho em seu genoma, incluindo elementos que codificam fatores de virulência (MASSEY, 2006).

³² Hospitalares. Instituições com um corpo clínico organizado que presta cuidados médicos aos pacientes (DeCS, 2017).

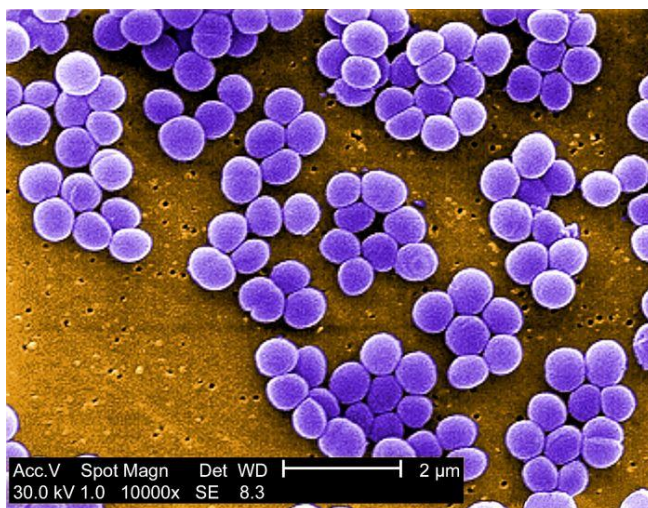


Figura 4. *Staphylococcus aureus* - Bactéria potencialmente patogênica encontrada em membranas nasais, pele, folículos pilosos e períneo de animais homeotérmicos. Podem causar diversos tipos de infecções e intoxicações. (DeCS, 2018) Fonte: Janice Haney Carr, 2001

Os gêneros *Streptococcus* (Figura 5) e *Enterococcus* compreendem bactérias Gram + de grande importância clínica e epidemiológica, sendo a maioria das espécies componentes da microbiota natural humana. *Streptococcus* tem ao menos 135 espécies conhecidas que colonizam as membranas mucosas humanas e animais. Espécies como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae* são altamente virulentas e causam infecções e doenças como febres reumáticas e escarlates, pneumonia ou sepse neonatal. Os estreptococos são classificados com base na morfologia da colônia, tipo de hemólise e especificidade sorológica (KOSECKA-STROJEK, 2020).

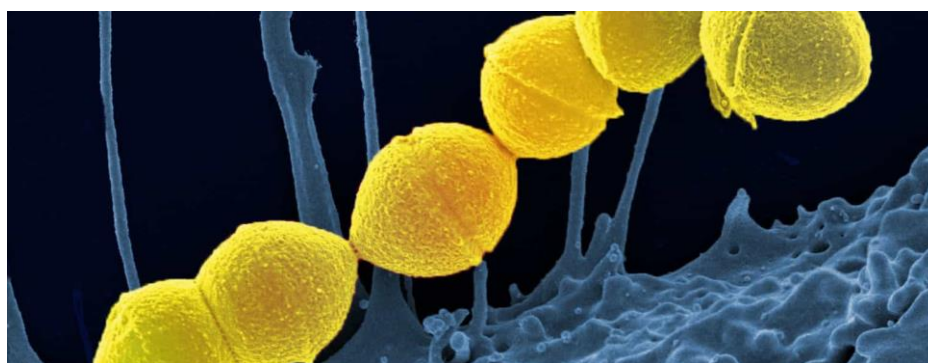


Figura 5. *Streptococcus* spp. - Gênero de bactérias cocóides Gram positivas (Gram +) cujos organismos ocorrem em cadeias. Endosporos³³ não são produzidos. Várias espécies existem como comensais ou parasitas do homem e animais, sendo que algumas espécies são altamente patogênicas. Algumas espécies são saprofíticas³⁴ e ocorrem no ambiente natural (DeCS, 2015). Fonte: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID,2019

³³ Grupo de cocos cujas relações taxonômicas são incertas. Formam endosporos, têm corpos de parede espessa no interior de células vegetativas de certas bactérias, e são capazes de passar por condições ambientais adversas por períodos prolongados (DeCS,2009).

³⁴ Organismo que obtém seus nutrientes de matéria orgânica em decomposição (MICHAELIS,2021).

Peptostreptococcus spp. (Figura 6) é uma bactéria em forma de cocos Gram + anaeróbia e é parte da microbiota comensal oral e intestinal. Essa bactéria é um agente etiológico de inúmeras doenças incluindo (1) endocardite, (2) abscessos hepáticos, (3) doença periodontal, (4) infecções do canal radicular e (5) infecções de feridas (DE SOUZA, 2018).

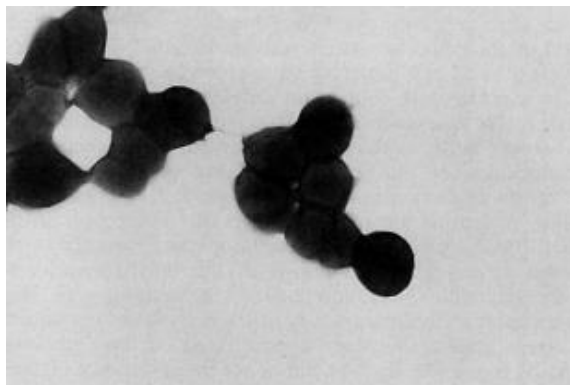


Figura 6. *Peptostreptococcus* spp. Gênero de bactérias cocóides, Gram positivas (Gram +) e anaeróbias, que são parte da microbiota normal de humanos. Seus organismos são patógenos oportunistas, causando bacteremias e infecções de tecido mole (DeCS, 2015). Fonte: Van Dalen,1993.

1.2.3 BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS (GRAM -)

Escherichia coli (Figura 7) é uma bactéria Gram –, comensal do trato gastrointestinal e normalmente não é patogênica para humanos. Entretanto, várias cepas de *E. coli* têm a capacidade de causar várias doenças em diferentes locais, incluindo o sistema renal, o trato gastrointestinal, feridas e o sistema nervoso central (ALHARBI, 2019; BRASIL, 2004).



Figura 7. - *Escherichia coli* - Espécie de bactéria Gram negativa (Gram –), facultativamente anaeróbia, em forma de bastão comumente encontrada na parte mais baixa do intestino de animais de sangue quente. Geralmente não é patogênica, embora algumas linhagens sejam conhecidas por produzir diarreia e infecções pirogênicas. As linhagens patogênicas são classificadas pelos seus mecanismos patogênicos específicos como toxinas (DeCS, 2009). Fonte: KAPER,2004.

Pseudomonas aeruginosa (Figura 8) é um bacilo Gram-negativo ambiental comum, além de ser encontrada também em ambiente hospitalar como (1) pisos, (2) grades de camas, (3) pias e (4) as mãos dos profissionais de enfermagem. Essa espécie de bactéria, *P. aeruginosa*, atua como um patógeno oportunista em várias circunstâncias, principalmente em pacientes imunossuprimidos e em infecções de feridas causadas por queimaduras. Igualmente, *P. aeruginosa* é capaz de produzir elastase³⁵, inibindo assim a integridade da membrana basal do hospedeiro disseminando a infecção (LYCZAK, 2000).

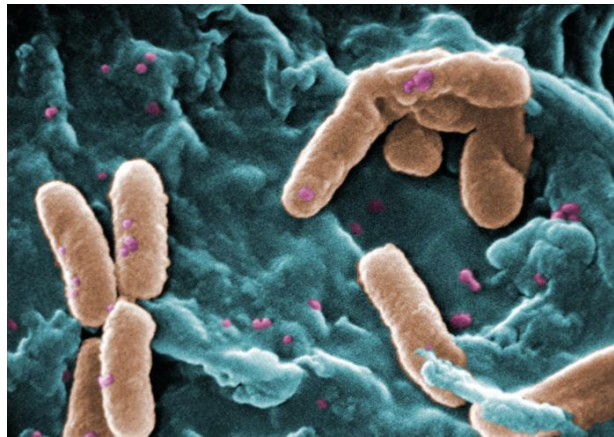


Figura 8. *Pseudomonas aeruginosa* - Espécie de bactérias em bastonete, Gram negativa (Gram –) e aeróbias, comumente isoladas de amostras clínicas (feridas, queimaduras e infecções do trato urinário). Também é amplamente distribuída no solo e na água. *P. aeruginosa* é um dos principais agentes de infecção hospitalar. (DeCS, 2009).Fonte: Janice Haney Carr, 2011.

Morganella morganii (Figura 9) é um bacilo Gram – em forma de bastonete, além de ser um raro patógeno oportunista predominantemente isolado de infecções nosocomiais. Esta espécie pertence à família *Enterobacteriaceae* e foi isolado pela primeira vez em amostra fecal no ano de 1906 por um pediatra. Ele é considerado um patógeno incomum ao ser humano, amplamente distribuído no meio ambiente e na microbiota intestinal normal de humanos, mamíferos e répteis. *M. morganii* causa diversas infecções, tal como (1) infecções do trato urinário, (2) úlceras genitais, (3) pericardite, (4) infecções de feridas nas extremidades do pé e (5) septicemia (BANDY,2020).

³⁵ A enzima quebra a elastina, a proteína específica das fibras elásticas, e digere outras proteínas tais como a fibrina, hemoglobina e albumina (DeCS, 2009)

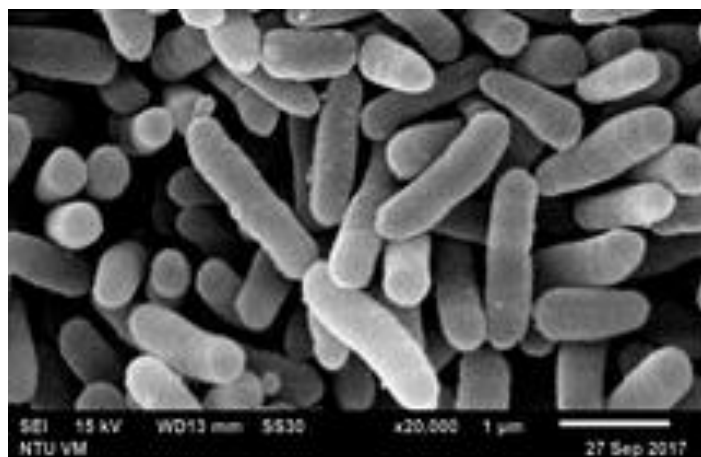


Figura 9. *Morganella morganii* - Espécie de *Morganella* previamente classificada como espécie de *Proteus*. É encontrada em fezes de humanos, cães, outros mamíferos e répteis. (DeCS,2009). Fonte: KUNG, 2020

Proteus mirabilis (Figura 10) pode ser encontrado no solo, fontes de água e esgoto. Além disso é um microrganismo comensal do trato gastrointestinal de humanos e outros animais. Este tipo de bactéria pode causar diversas infecções, mas principalmente as Infecções do Trato Urinário (ITU) associadas à inserção de cateteres. *P mirabilis* podem induzir formação de cálculos na bexiga, nos rins podendo até progredir para um quadro de septicemia³⁶, que possui alto prognóstico³⁷ de mortalidade (ARMBRUSTER, 2018).

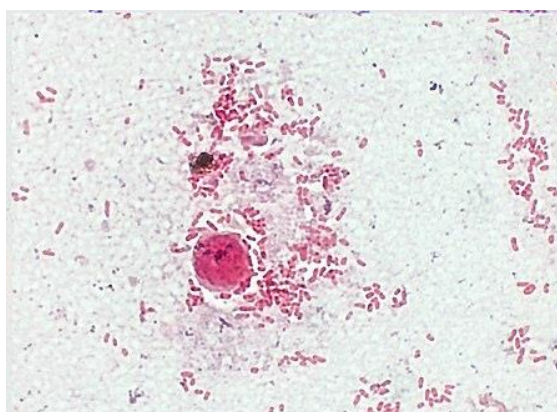


Figura 10. *Proteus mirabilis* - Espécie bacteriana Gram negativa (Gram –), facultativamente anaeróbia e em forma de bastonete, que é frequentemente isolada de amostras clínicas. O local mais comum de infecção é o trato urinário (DeCS, 2009).Fonte: Kreisleriana, 2020

³⁶ Síndrome de resposta inflamatória sistêmica com uma etiologia infecciosa suspeita ou comprovada. (DeCS,2020)

³⁷ Predição do provável resultado de uma doença baseado nas condições do indivíduo e no curso normal da doença como observado em situações semelhantes (DeCS,2016).

Klebsiella spp. (Figura 11) são onipresentes na natureza. Elas provavelmente têm dois habitats comuns sendo um o meio ambiente onde são encontrados na água de superfície, esgoto, solo e em plantas. Mesmo assim, os principais reservatórios patogênicos para a transmissão de *Klebsiella* são o trato gastrointestinal e as mãos dos profissionais da área hospitalar. Por isso, *Klebsiella* frequentemente causam infecções nosocomiais. A espécie mais importante, *Klebsiella pneumoniae*, é responsável por proporções significativas de infecções do trato urinário adquiridas em hospitais, pneumonia, septicemias e infecções em tecidos moles. Contudo, representam apenas de 2 a 4% das infecções de ferida devido à ampla disseminação de cepas resistentes a antibióticos, especialmente de cepas produtoras de β -lactamase que apresentam amplo espectro (PODSCHUN, 1998).



Figura 11. *Klebsiella* spp - Gênero de bactérias Gram negativa (Gram -), facultativamente anaeróbias e em forma de bastonete, cujos organismos se arranjam individualmente, aos pares ou em cadeias curtas. Este gênero é comumente encontrado no trato intestinal e é um patógeno oportunista que pode levar a septicemia, pneumonia, infecções do trato urinário e outros tipos de infecção humana (DeCS, 2009) Fonte: Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas, National Institutes of Health, 2020

A patogênese de *Edwardsiella* spp. (Figura 12) e suas doenças têm seu mecanismo amplamente desconhecido. As bactérias entéricas pertencem à microbiota comensal que habitam os animais as quais são oportunistas, pois tem o potencial de causar infecções em indivíduos que apresentam imunossupressão. Elas representam diversas espécies bacterianas,

como, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Edwardsiella* e *Yersinia*, são zoonoses³⁸. Membros da *Edwardsiella* estão associados a ambientes de água doce ou marinha e são transmitidos aos humanos por contato ou ingestão de animais aquáticos malcozidos e é transmitida também por animais domésticos. Cerca de 80% das infecções causadas por *Edwardsiella* spp. originam gastroenterites semelhante às infecções por *Salmonella*. Já 20% restantes das infecções humanas são doenças extra intestinais como mionecrose, infecções de tecidos moles, meningite, peritonite com septicemia e infecções de feridas (LEUNG, 2012).

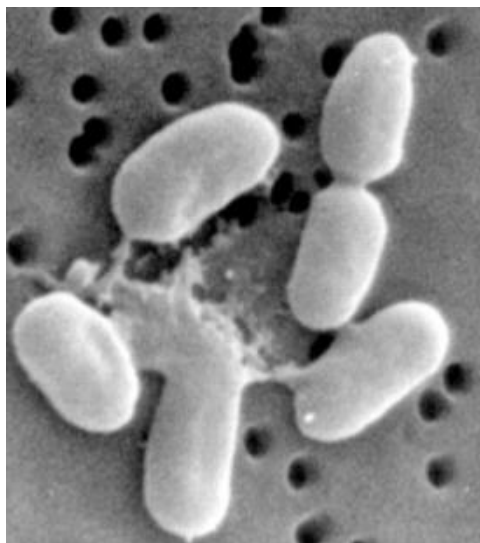


Figura 12. *Edwardsiella* spp. - Gênero bacteriano em forma de bastonetes, Gram negativa (Gram –), anaeróbios facultativos, geralmente com motilidade devido aos flagelos. Membros deste gênero geralmente são encontrados nos intestinos de animais de sangue frio e em água doce (DeCS, 2009). Fonte: DU, 2007.

1.3 ABORDAGEM TERAPÊUTICA - SUS

Os curativos utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no tratamento das feridas cutâneas devem atender sete requisitos: (1) não permitir acúmulo de exsudato, (2) manter a umidade na ferida, (3) permitir trocas gasosas, (4) proteger contra infecção, (5) fornecer isolamento térmico, (6) não possuir agentes tóxicos e (7) sua remoção não deve gerar traumas locais. E segundo o manual do pé diabético (2016, p.47) o tratamento padrão se resume a quatro alternativas conforme se observa no quadro abaixo.

³⁸ Doenças de animais que podem ser transmitidas aos humanos ou podem ser transmitidas dos humanos para os animais (DeCS, 2020).

Quadro 1. Coberturas utilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no tratamento das feridas cutâneas. Fonte: O Autor, 2021.

Coberturas	Descrição	Indicações	Periodicidade de troca
Hidrocoloide	Curativo autoadesivo composto de ativo hidrocoloide de Carboximetilcelulose sódica. Possui capacidade de absorver o exsudato, é permeável para gases, porém forma uma camada oclusiva para líquidos e microrganismos (LM FARMA, 2021).	Feridas epitelizadas.	Até 7 dias
		Feridas que apresentam tecido de granulação com nenhum ou pouco exsudato do tipo seroso sanguinolento.	
		Tecido necrótico úmido ou esfácelo com pouco exsudato do tipo seroso, sanguinolento ou serossanguinolento.	
Ácidos graxos essenciais	Composto por 9 ácidos graxos (ácido linoleico, ácido oleico, ácido caprílico, ácido palmítico, ácido láurico, ácido cáprico, ácido cáproico, ácido mirístico e ácido esteárico), vitamina A, vitamina E e Lecitina de soja, que promovem ação hidratante e emoliente ¹ na pele (LM FARMA, 2021).	Tecido epitelizado	1 a 2 vezes por dia
Alginato de cálcio e sódio	Curativo constituído de fibras de algas marinhas ricas em Ácido Manurônico, Ácido Gulturônico e ions cálcio e sódio. promovem desbridamento ² autolítico ³ e absorvem o exsudato transformando-o em um gel hidrofílico, mantendo assim a umidade ideal na ferida. (LM FARMA, 2021)	Feridas que apresentam tecido de granulação com exsudato do tipo seroso ou serossanguinolento de quantidade moderada a abundante.	Até a saturação ou, no máximo, 7 dias
		Feridas que apresentam tecido de granulação com exsudato do tipo sanguinolento de quantidade moderada a abundante.	
Sulfadiazina de prata	Antimicrobiano de amplo espectro, abrangendo bactérias Gram +, Gram – e fungos. Esse medicamento possui dois mecanismos de ação conhecidos. O primeiro consiste nos ions de prata que reagem com o DNA (Ácido desoxirribonucleico) dos microrganismos impedindo sua replicação. E o outro que esse medicamento age por pressão osmótica comprometendo as paredes celulares, gerando assim, seu rompimento (SILVESTRE, 2021).	Feridas que possuem granulação com colonização crítica ou infecção e exsudato seropurulento, purulento ou piosanguinolento de quantidade moderada a abundante. Tecido necrótico úmido ou esfácelo com exsudato do tipo seropurulento, purulento ou serossanguinolento em quantidade moderada a abundante	Até saturação

¹ Que tem a propriedade de amolecer ou abrandar a pele ou abrandar uma membrana mucosa irritada (MICHAELIS,2021).

² Remoção de um material estranho e tecido desvitalizado ou contaminado de ou adjacente a uma lesão traumática ou infectada até que tecido sadio circundante seja exposto (DeCS,1995).

³ Desintegração espontânea de tecidos ou células pela ação de suas próprias enzimas autógenas (DeCS,1999).

Por essas vantagens os curativos são amplamente utilizados para proteger a ferida e promover a cicatrização (REIS, 2013). Entretanto, no estudo de Dumville *et. al.* (2012, p.1909), que avalia diversos curativos, foi observado que não houve diferença significativa na cicatrização entre curativos mais caros em comparação com alternativas mais econômicas tampouco entre curativos contendo ou não antimicrobianos e antissépticos.

1.4 ABORDAGEM TERAPÊUTICA - RAPHA®

Nosso grupo desenvolveu um sistema terapêutico composto pelo uso combinado de LEDterapia com a BLN, denominado sistema terapêutico RAPHA®. Este sistema foi desenvolvido na Universidade de Brasília – UnB, consulta de patente (BR 102016019963-8 A2) – para aplicação direta em processos inflamatórios humanos internos e externos. Foi observado em estudo clínico que os participantes de pesquisa apresentaram melhoria no processo de cicatrização em outros aspectos, como (1) na qualidade de vida, (2) no humor e autoestima e (3) na qualidade de trabalho e deslocamento (ROSA, 2018).

Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que a terapia promovida pelo RAPH[®] resultou em cicatrização de até 99% em ratos portadores de diabetes que receberam tratamento com BLN contendo lipossomas com curcumina e LED (RAPH[®] *plus*) Silva (2020, p.30). Ainda, observaram-se excelentes resultados em humanos de acordo com o ensaio clínico conduzido por Santana (2021, p.79). Os participantes de pesquisa que receberam tratamento com BLN contendo curcumina e LED (RAPH[®] *Plus*) tiveram um resultado médio de cicatrização de feridas de 89% em apenas 45 dias.

Na presente pesquisa será analisada a composição e quantidade de microbiota cultivável oriunda das úlceras de participantes de pesquisa portadores de UPD antes e após o tratamento com o RAPH[®] e RAPH[®] *Plus*. Nossa hipótese é que o tratamento induz redução ou remissão da infecção na úlcera dos participantes e que esta alteração esteja relacionada a melhor cicatrização em relação ao tratamento convencional realizado no Sistema Único de Saúde (SUS). Essa hipótese é sustentada pelo fato de que a curcumina apresenta efeito anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano (AKRAM, 2010).

1.4.1 ABORDAGEM TERAPÊUTICA – BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL (BLN)

Os produtos registrados para o tratamento de UPD não são totalmente eficientes e apresentam custos elevados (REIS, 2013). Nosso grupo tem se empenhado em explorar novas estratégias terapêuticas para UPD que sejam mais eficazes e de baixo custo. Neste contexto, destaca-se a utilização de curativo baseado em biomembrana de látex natural (BLN). Estudos prévios demonstram que a BLN promoveu cicatrização e remodelagem tecidual em úlceras isquêmicas em perna humana (FRADE, 2003) e em UPDs sem causar efeitos adversos, gerando boa aceitação do participante de pesquisa no tratamento com a BLN (REIS, 2013; NUNES, 2016; ROSA, 2018; LÓPEZ-DELIS, 2018; AGNELLO, 2018; ROSA, 2019; SILVA, 2020; SANTANA, 2021; FERREIRA, 2021).

O látex é um composto natural extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Após corte em seu caule, a árvore expele um líquido de aspecto branco leitoso, que possui em sua composição 5% de macromoléculas não vinculadas a borracha (proteínas, lipídios, carboidratos e açúcar), 45% de fração de borracha (cis-polyisoprene) e 50% de água. O látex natural é um

cicatrizante natural da planta, ou seja, é um metabolito secundário utilizado para defesa própria, em situações de lesões (FERREIRA et al., 2009).

Devido a suas propriedades terapêuticas, seu baixo custo e ausência de risco de transmissão de patógenos o látex é um interessante recurso terapêutico. Como consequência da sua biocompatibilidade, o látex vem sendo explorado como biomaterial para diversas aplicações médicas (ROSA et al., 2019; SILVA, 2020). As suas propriedades estimuladoras de neovascularização, regeneração tecidual, neoangiogênese e formação de matriz extracelular tem sido comprovada em diferentes estudos realizados em várias espécies animais (ZIMMERMANN et al., 2007; PINHO et al., 2004; SILVA, 2020; SANTANA, 2021).

Em úlceras venosas, a BLN promoveu a organização do tecido cicatricial através da indução de fatores de crescimento como VEGF⁴³ (Vascular endothelial growth factor), TGF- β ⁴⁴ (Transforming growth factor beta 1) e redução da expressão da enzima iNOS⁴⁵ (induced nitric oxide synthase), favorecendo a cicatrização (FRADE, 2003).

Neste trabalho, propomos aplicar uma biomembrana de látex natural (BLN) contendo lipossomas para o carreamento de um biocomposto denominado curcumina visando a aumentar a eficiência de neoformação tecidual em relação ao uso exclusivo de látex natural.

1.4.2 ABORDAGEM TERAPÊUTICA – FOTOTERAPIA

A fototerapia produz efeitos químicos e, por isso, não altera significativamente a temperatura do local tratado, variando dentro da faixa de 0,1°C a 0,5°C. Tal feito é causado pela absorção dos fótons pelos cromóforos da pele estimulando o metabolismo celular (1) na permeabilidade, (2) metabolismo de mitocôndrias, (3) na síntese de ATP (Adenosina trifosfato), (4) na modulação da dor, (5) na inflamação e (6) na cicatrização tecidual. Assim, a fototerapia

⁴³ Membro da família dos fatores de crescimento da célula endotelial denominados fatores de crescimento do endotélio vascular. é produzido por uma ampla variedade de tipos celulares. Além de estimular o crescimento e a permeabilidade vascular, pode ter um papel na estimulação da vasodilatação através de vias dependentes do óxido nítrico (DeCS,2013).

⁴⁴ O TGF- β desempenha um papel no desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, secreção de hormônio e função imunológica. O TGF- β é encontrado principalmente como formas homodímeras de distintos produtos do gene TGF- β 1, TGF- β 2 ou TGF- β 3 (DeCS,2015).

⁴⁵ Subtipo de óxido nítrico sintase independente de Cálcio que pode desempenhar um papel na função imunológica. É uma enzima indutível cuja expressão é transcricionalmente regulada por uma variedade de Citocinas (DeCS,2017).

pode induzir a modulação de proteínas constituintes da pele como colágeno e a elastina (HOURELD, 2014; DE ABREU CHAVES, 2017).

Os efeitos da fotobiomodulação⁴⁶ promovida por LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) ou LED (Light Emitting Diode) sobre a cicatrização de feridas são bem descritos na literatura. É relatado que estas terapias induzem taxa aumentada de cicatrização de feridas. Contudo, ainda são necessários estudos que utilizem a fototerapia em combinação com outras técnicas para encontrar métodos ainda mais eficazes para induzir a cicatrização completa da ferida (KUFFLER, 2016).

LASER é uma fonte de luz monocromática, coerente com curto espectro de onda, com frações de nanômetros (nm) enquanto o LED é incoerente, ou seja, com maior espectro de onda variando entre 1 e 2 nm e é policromática (HEISKANEN, 2018). Sua aplicação na cicatrização de feridas contribuiu para o reparo tecidual cutâneo através dos efeitos anti-inflamatório e analgésico, promoção da proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e angiogênese, modulação do processo inflamatório e melhor organização das fibras de colágeno (FABRE, 2015; DE LIMA, 2014; SANTANA, 2021).

Demonstrou-se, em estudo *in vitro*, que a irradiação com o LED aumenta a viabilidade e morfologia de fibroblastos através do aumento do nível de proteínas de choque térmico, responsáveis por modular a homeostase celular, auxiliar no reparo após o estresse celular e promover a cicatrização de feridas (CHOI, 2019). Ainda, foi demonstrado em ensaios *in vivo* em que a terapia com LED estimulou a proliferação de queratinócitos na epiderme, bem como a deposição de colágeno na derme durante a fase de proliferação da cicatrização (TAKEO, 2015) e promoveu aumento de vasos sanguíneos, de VEGF e redução do COX-2⁴⁷ (TATMATSU-ROCHA, 2018).

O LED possui algumas vantagens sobre o LASER, como capacidade de irradiar grande área do corpo ao mesmo tempo e apresentar menor custo, maior segurança, a não emissão de luz térmica, não toxicidade e não invasividade, além da facilidade em uso doméstico. Essas características tornam a LEDterapia uma tecnologia mais acessível e aplicável na saúde do que outras modalidades. Essa terapia utiliza o LED como fonte luminosa terapêutica e tem sido

⁴⁶ Efeito Biológico gerado pela absorção de fótons pelos cromóforos da pele (DOS SANTOS MENDES-COSTA, 2020).

⁴⁷ Subtipo de prostaglandina-endoperóxido sintase expressa por indução. Desempenha importante papel em muitos processos celulares e na Inflamação (DeCS, 2006).

aplicada com diversas finalidades, que vão além da cicatrização de feridas, promovendo rejuvenescimento da pele, redução da inflamação, psoríase, dentre outros (DONG,2017).

Por promover neoformação vascular e por estimular a proliferação, granulação e reepitelização tecidual, uma alternativa viável para a modulação orgânica da ferida é a fototerapia, sendo seu representante mais promissor o diodo emissor de luz - LED, apresentando um custo menor comparado com o LASER. O LED é utilizado com comprimento de onda que varia de 405 nm (azul) a 940 nm (infravermelho) (SINGH, 2001; NGUYEN, 2016; MOREIRA, 2009; YANG, 2019; WANG, 2020; WOJCIK, 2020).

O estudo realizado por Vitoriano (2019, p.1370) comparou as terapias com LASER e LED em ensaio clínico para promover a cicatrização de úlceras diabéticas. Ambos os tratamentos demonstraram promover reparo tecidual e melhorar os sinais e sintomas neuropáticos em pacientes com DM. No entanto, os resultados demonstraram taxa de cicatrização mais alta nas feridas tratadas com LED do que com LASER, ressaltando que estudos complementares são necessários para compreender a superioridade entre as terapias.

Visando os efeitos benéficos da LEDterapia para o tratamento de feridas foi desenvolvido um equipamento móvel para neoformação tecidual – dispositivo terapêutico RAPHA® – associado a uma biomembrana de látex natural, para promover a cicatrização de feridas diabéticas (SANTANA,2021).

1.5 ABORDAGEM TERAPÊUTICA – *Curcuma longa* E CURCUMINA

A *Curcuma longa* L. (Figura 13A) é uma planta pertencente à família *Zingiberaceae*. Popularmente conhecida como açafrão-da-terra ou cúrcuma, trata-se de uma planta herbácea, perene e que apresenta rizoma⁴⁹ ovoide podendo alcançar até 10 cm de comprimento. Quando cortados, apresentam coloração amarelo avermelhada, exalando nota olfativa *Sui generis*⁵⁰, além de apresentar sabor picante. A *Curcuma longa* L. é uma planta originária da Índia e do sudeste da Ásia. Esta espécie se desenvolve em solo úmido e argiloso, adaptando-se bem na maioria dos países tropicais. É uma planta utilizada há 6.000 anos pela medicina tradicional Indiana, a Ayurveda. É comumente prescrita na prevenção e controle de desordens físicas que

⁴⁹ Caule horizontal subterrâneo semelhante a raiz, produzindo brotos aéreos e raízes subterrâneas. Distinguem-se das raízes verdadeiras, que não possuem botões e nós. Semelhantes a raízes verdadeiras por serem subterrâneas e mais espessos por armazenar depósitos de reserva (DeCS, 2016).

⁵⁰ Que não apresenta semelhança com nenhuma outra pessoa ou coisa; original, peculiar (MICHAELIS,2021).

incluem resfriado, comprometimento de vias aéreas, sinusite, infecções bacterianas, alterações hepáticas, diabetes, feridas, reumatismo e anorexia. A parte da planta comumente utilizada é o rizoma e é empregado como corante alimentício, tempero ou suplemento alimentar (MARCHI, 2016).

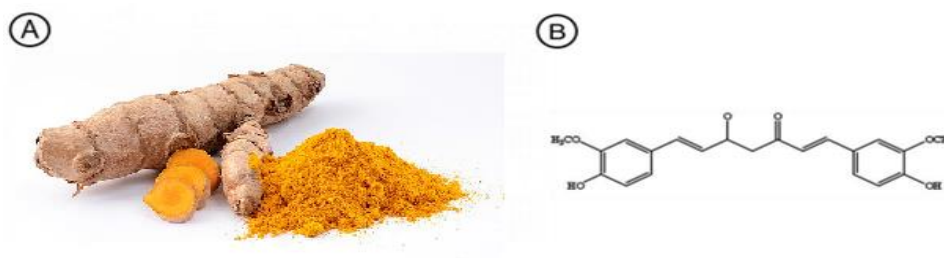


Figura 13. (A) *Curcuma longa* em Rizoma e em pó Fonte: EUGSTER,2014 e (B) Estrutura química do principal curcuminóide da *Curcuma longa*, a Curcumina. Fonte: AKBIK,2014.

A curcumina é um curcuminóide lipossolúvel e está presente no açafrão (*Curcuma longa*) (Figura 13B) sendo também usada para tratamento de úlceras diabéticas (AKBIK *et al.*, 2014). Estudos prévios demonstraram que a curcumina apresenta efeitos antiinflamatório, antioxidante, anticoagulante e antibiótico. Além disso, foi relatado que este curcuminóide apresenta propriedade cicatrizante, visto que favorece (1) a redução da resposta de oxidação e inflamação, (2) formação de tecido de granulação, (3) deposição de colágeno, (4) remodelação tecidual e (5) contração da ferida. Portanto, a curcumina representa um biocomposto com grande potencial para uso como material para cicatrização de úlceras (AKRAM, 2010; EMIROGLU *et al.*, 2017; DAI *et al.*, 2017).

Na cicatrização de feridas, a curcumina reduz a oxidação e inflamação, promove a migração de fibroblastos, a formação do tecido de granulação e a deposição de colágeno. Ainda, controla a apoptose das células na ferida favorecendo a reepitelização, remodelação tecidual e contração da ferida (AGGARWAL, 2009). Em ratos diabéticos, a administração da curcumina, tanto por via oral (40 mg de curcumina para cada quilograma de peso) quanto tópica (0,1% de curcumina veiculada em polietilenoglicol), melhorou o reparo de feridas promovendo reepitelização, neovascularização aprimorada, migração aumentada de várias células, incluindo miofibroblastos dérmicos, fibroblastos e macrófagos para o leito da ferida e maior conteúdo de

colágeno. Também, esse curcuminóide induziu aumento do TGF- β 1 em feridas tratadas com curcumina em comparação com o grupo controle (SIDHU,1999).

Ainda, diversos estudos foram realizados visando avaliar os efeitos da curcumina em feridas diabéticas. Foi demonstrado que o fitocomposto, associado a nanofibras ou na forma de gel, induziram atividade antioxidante e antiinflamatória em ratos diabéticos, acelerando a cicatrização das feridas diabéticas (KANT, 2014; MERRELL, 2009; KANT, 2015).

Apesar do exposto, a curcumina apresenta pouca biodisponibilidade no organismo devido às suas propriedades lipofílicas e isto, conseqüentemente, resulta, na sua baixa estabilidade química e rápida eliminação pelo organismo. Assim, seu uso terapêutico é limitado. Por fim, uma estratégia viável para aumentar a biodisponibilidade é a utilização de nanoestruturas como os lipossomas (SILVA, 2020).

1.6 ABORDAGEM TERAPÊUTICA - LIPOSSOMAS

Lipossomas são estruturas vesiculares constituídas por uma ou várias bicamadas lipídicas, assemelhando-se a membranas celulares. Os fosfolipídios apresentam natureza anfifílica, ou seja, possuem uma região hidrofílica e outra lipofílica. Por isso, são utilizados como carreadores versáteis de fármacos⁵¹ hidrofílicos e lipofílicos. Os lipossomas são constituídos predominantemente por fosfolipídios, encontrados abundantemente em diversos tecidos, incluindo tecidos nervosos. Lipossomas apresentam maior biodisponibilidade no organismo visto sua similaridade de composição orgânica melhorando, assim, a absorção e meia-vida de compostos a ele associados (SILVA, 2020; HOEKMAN et al. 2014).

Lipossomas melhoram a captação celular, tecidual e a distribuição dos compostos terapêuticos para os locais-alvo. Essas nanovesículas fosfolipídicas podem veicular substâncias com características lipofílicas, hidrofílicas e/ou ambas. Por exemplo, moléculas bioativas lipofílicas podem ser incorporadas no interior da bicamada lipídica, enquanto moléculas hidrofílicas podem ser inseridas na região central aquosa, conforme podemos observar na Figura 14 (SILVA, 2020).

⁵¹ Substância química ativa, fármaco, droga ou matéria-prima que tenha propriedades farmacológicas com finalidade medicamentosa, utilizada para diagnóstico, alívio ou tratamento, empregada para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos, em benefício da pessoa na qual se administra (BRASIL,2021).

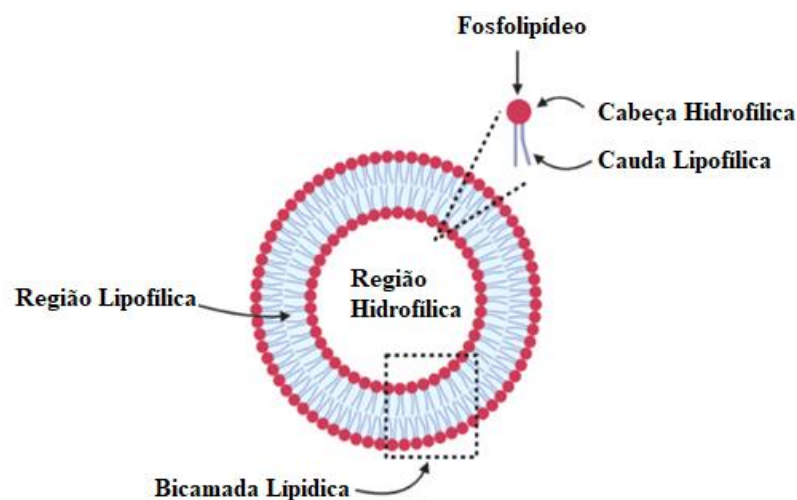


Figura 14. Lipossomas. - São vesículas compostas por bicamadas lipídicas fechadas, amplamente empregadas como veículos para entrega de fármacos por possibilitar o carreamento de moléculas imiscíveis em água tais como curcumina na região lipofílica. Possibilitando ainda carreamento de outro fármaco hidrossolúvel na região hidrofílica. Fonte: Adaptado de SILVA, 2020.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações da composição de microbiota cultivável em Úlcera de pé diabético (UPD) durante o tratamento realizado pela associação de equipamento diodo emissor de luz LEDs (RAPHA®) associado a biomembranas de látex natural (BLN) contendo lipossomas com curcumina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a população microbiana cultivável da úlcera no momento que precede (Coleta Inicial - CI) e imediatamente após (Coleta Final - CF) a intervenção terapêutica.
- Identificar as espécies bacterianas cultiváveis que colonizam a úlcera dos participantes antes e após a intervenção terapêutica, nos dias D0, D22 e D45 por meio de ensaios microbiológicos e bioquímicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL

As Biomembranas de Látex Natural (BLN) (Figura 15), utilizadas para a realização dos ensaios, foram preparadas utilizando látex natural bicentrifugado pré-vulcanizado (Du Latex Produtos Industriais Ltda. São Paulo, Brasil). Os lipossomas foram confeccionados pelo nosso grupo de pesquisa. Foi utilizado um método adaptado de MOHAMMED et al., 2004 empregando fosfolípido (Lipoid E 80/Lipoid, Alemanha) e colesterol (Sigma, USA) em solvente orgânico (mistura de clorofórmio e metanol). Após a solubilização dos lipídios, a solução foi submetida à secagem em rotaevaporador (BUCHI) para formação do filme lipídico. O filme foi hidratado com tampão fosfato salina, a pH 7,4 (PBS), sob vigorosa agitação magnética (SILVA, 2020).

A confecção das biomembranas de látex com e sem curcumina foi realizada nas instalações do Laboratório de Engenharia e Inovação da Universidade de Brasília (LEI – UnB). Os Lipossomas com curcumina foram adicionados antes do processo de vulcanização do látex (SILVA, 2020). A BLN aplicada no tratamento dos participantes de pesquisa trata-se de um artigo semicrítico⁵⁵ visto que fica em contato com a pele não íntegra. Por isso, é necessário realizar a sua desinfecção⁵⁶ ou esterilização⁵⁷ para uso clínico.

Um método eficaz para esterilização de biomateriais consiste no vapor de baixa temperatura e formaldeído (VBTF). O VBTF possui como agente esterilizante o formaldeído em uma solução a 2% submetida a vapor em baixa temperatura ($55 \pm 5^\circ\text{C}$). Esse processo produz a desnaturação de grupos funcionais de proteínas estruturais e do DNA bacteriano. O formaldeído associado com o vapor d'água favorece o processo de penetração desse agente nas células bacterianas (BRASIL, 2009; GOVEIA, 2007; MAGRINI, 2019)

Todas as biomembranas foram enviadas para a empresa Sterimed Cedral Serviços de Esterilização Ltda (São Paulo, Brasil) e esterilizadas pelo método VBTF (Laudo de

⁵⁵ Segundo a Portaria Nº 3.012/2009 - "Regulamento Técnico Mercosul para Produtos com Ação Antimicrobiana Utilizados em Artigos Críticos e Semi-críticos, Áreas Críticas e Semi-Críticas e Esterilizantes"

⁵⁶ Processo físico ou químico que destrói todos os microrganismos de objetos inanimados e superfícies, exceto um número elevado de esporos bacterianos (BRASIL, 2009).

⁵⁷ Processo validado que serve para fazer um objeto inanimado e superfície livre de todas as formas viáveis de microrganismos (BRASIL, 2009).

esterilização – Anexo 3). Estudos prévios demonstraram que esse método de esterilização não seria o mais indicado para materiais como o látex, devido a possível dificuldade de se extrair o formaldeído impregnado na superfície da BLN, além de diminuir sua força tênsil (GOVEIA, 2007; BORINI, 2016). Devido a sensibilidade do produto a altas temperaturas, nosso grupo avaliou a relação custo-benefício entre o método VBTF e outros métodos de esterilização disponíveis no mercado e por fim decidiu por esse método. Para validar esta metodologia realizou-se análises para avaliar a integridade da BLN após o processo de esterilização. Não se observou alterações nas propriedades físicas e químicas na BLN (dados não publicados). Além disso, como a BLN é cortada e posicionada no leito da úlcera sua força tênsil torna-se irrelevante.

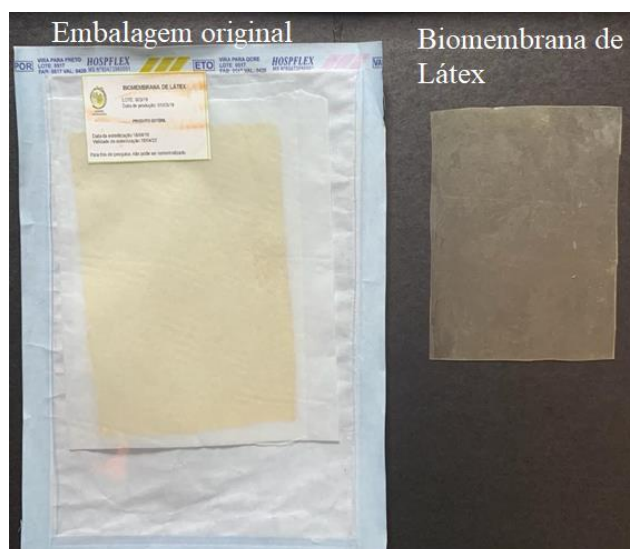


Figura 15. Biomembrana de látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* vulcanizado e veiculado com lipossomas de curcumina. Fonte: O autor, 2020.

3.2 DISPOSITIVO RAPHA®

O diodo emissor de luz (LED) faz parte do dispositivo terapêutico RAPHA® (Figura 16) e consiste em um sistema móvel para neoformação tecidual baseado nos princípios de fototerapia que visa auxiliar a cicatrização de feridas (REIS, 2013).

Esse dispositivo de fototerapia móvel é um sistema eletrônico que contém um temporizador, uma campainha e um controlador para a corrente que alimenta o LED. Ademais,

a placa tem 30 LEDs de alta potência, com comprimento de onda entre 635 e 640 nm (luz vermelha) em um rearranjo hexagonal para melhor homogeneidade e emissão de alta pureza, com uma potência de 1800 MW e uma densidade de energia de 25 J /cm² na forma de pulsos de luzes sequenciais, com um tempo de radiação programado para 35 minutos. O equipamento tem as seguintes dimensões 13 cm altura x 8,5 cm comprimento x 5,5 cm largura e um peso total de 600 g (ROSA, et al., 2019).



Figura 16. Equipamento de neoformação tecidual com LED de alta potência com comprimento de onda entre 635 e 640 nm (luz vermelha) RAPHA®. Fonte: O autor, 2020.

3.3 CONDOTA EXPERIMENTAL COM OS PARTICIPANTES

O projeto foi submetido ao Comitê De Ética Humano (CEP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em julho de 2018, sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAEE) de número 95910718.5.0000.0030 (Anexo 2). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da participação do projeto. Em estudos preliminares, foi feito um ensaio clínico com participantes de pesquisa no Hospital Regional de Ceilândia (HRC) em Brasília-DF, o que norteou os procedimentos que foram adotados para o ensaio do presente estudo (LÓPEZ-DELIS *et al.*, 2018).

Como critérios de inclusão para o estudo, o participante deveria ter entre 18 e 75 anos de idade, ser portador de diabetes mellitus tipo I ou II, UPD com indicação de tratamento ambulatorial, histórico da ferida com, pelo menos, três semanas de duração, não possuir alergia ao látex, não ter comprometimento da autonomia mental e possuir telefone celular com capacidade para realizar fotografias e ter o aplicativo WhatsApp. Foram excluídos da pesquisa os pacientes diabéticos que faziam uso irregular de medicação para outras doenças ou mesmo sem acompanhamento médico regular. Também se excluiu do estudo os participantes que possuíam evidências de osteomielite ou gangrena, etilistas, usuários de drogas ilícitas, portadores de doenças crônicas que comprometessem a pesquisa, lactantes ou participantes que já fizeram parte de estudos clínicos em período inferior a um ano.

A população do estudo foi composta por indivíduos portadores de úlceras diabéticas de membros inferiores, com indicação de tratamento ambulatorial. Foram selecionados 15 participantes com tais características e que foram distribuídos em três grupos experimentais (n=5), sendo GC o grupo controle enquanto GE1 e GE2 referem-se a grupos experimentais em que se empregou biomembrana de látex sem (GE1) ou com curcumina (GE2). A fim de diferenciar a adição de tecnologia utilizou-se, neste trabalho, a terminologia RAPHA[®] para o grupo GE1, o qual utilizou BLN sem curcumina e RAPHA[®] Plus, para o grupo que utilizou BLN com curcumina (Figura 17). Ambos os grupos – GE1 e GE2 – usaram LED concomitantemente ao uso do curativo sob a úlcera diariamente por um período de 45 dias. A irradiação com diodo emissor de luz (LED) foi feita no comprimento de onda vermelho ($\lambda = 636 \pm 20$ nm).

Os participantes do GC receberam os curativos e tratamento do protocolo SUS realizados pela equipe de saúde especializada do Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), no Ambulatório de Diabetes, duas vezes por semana. Já os participantes dos grupos GE1 e GE2 receberam tratamento com uso de BLN e de LED (RAPHA[®] e RAPHA[®] Plus) em suas residências e a equipe de acompanhamento realizava a visita domiciliar de uma a duas vezes por semana.

O protocolo de tratamento para os grupos GE1 e GE2 foi realizado de forma autônoma ou com auxílio de algum familiar. Os curativos eram trocados diariamente após a exposição ao LED. Os participantes dos grupos GE1 e GE2 também recebiam acompanhamento ambulatorial no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN, Ambulatório de Diabetes), de 15 em 15 dias para avaliação da equipe de saúde.

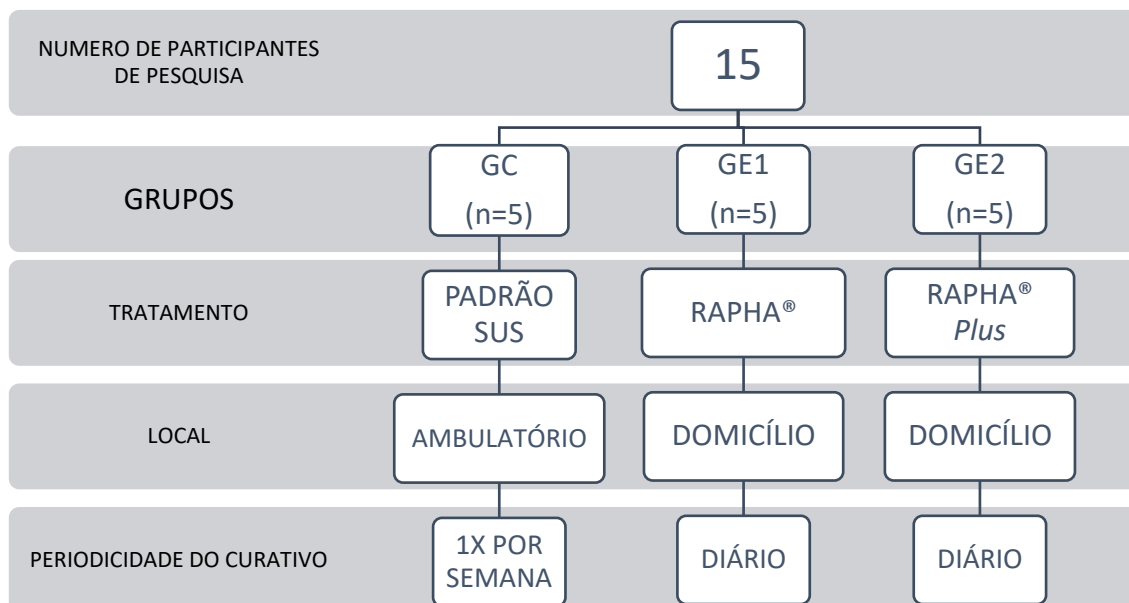


Figura 17. Desenho experimental do estudo – Grupos de avaliação: (1) grupo controle (GC), (2) grupo experimental 1 (GE1) e (3) grupo experimental 2 (GE2). Cada grupo composto por cinco participantes. É demonstrado no fluxograma o tipo de tratamento realizado, local de tratamento e periodicidade de troca do curativo. Fonte: O autor, 2020.

O protocolo experimental consistia na limpeza da ferida com soro fisiológico (NaCl à 0,9%) em quantidade suficiente para tal. A biomembrana de látex era cortada no formato da ferida, estendendo-se sobre toda a área ulcerada como cobertura primária e o equipamento RAPHA® era posicionado sobre a BLN e mantido ligado durante 35 minutos. Então, o curativo era finalizado com gaze e atadura (Figura 18).



Figura 18. Aplicação do protocolo experimental. A) Úlcera diabética após limpeza com soro fisiológico 0,9%. B) Biomembrana de látex cortada e colocada sobre a úlcera conforme tamanho da ferida. C) Aplicação do protocolo experimental utilizando biomembrana de látex e LEDterapia. D) Curativo finalizado utilizando a biomembrana de látex como cobertura primária e fechado com gaze e atadura. Fonte: Santana, 2021.

As amostras biológicas oriundas das úlceras dos participantes foram obtidas no início (dia 0), durante (dia 22) e ao final (dia 45) do protocolo de tratamento, a fim de se avaliar a

população microbiana das feridas por meio de análises microbiológicas. Foram realizadas coletas em dois momentos sendo: (1) Coleta Inicial (CI) ao retirar o curativo, antes de iniciar o protocolo e (2) a Coleta Final (CF) ao término do protocolo. Após a limpeza e retirada do curativo era colocado um novo curativo antes de se iniciar a irradiação por LED na úlcera .

Para coleta das amostras microbiológicas, foi utilizada haste plástica estéril (Swab, figura 19). Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em tubo contendo meio de transporte bacteriano - STUART (KASVI, BRASIL) - à temperatura ambiente. Os tubos contendo as amostras em meio STUART foram mantidos e analisados no Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos (LAMP) no Departamento de Biologia Celular localizado no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (IB – UnB), *Campus Darcy Ribeiro*.



Figura 19. Swab e meio de transporte STUART estéril – haste plástica flexível denominada Swab utilizada para coletas de materiais biológicos em UPD acompanhado de meio de transporte STUART não seletivo para manutenção da viabilidade microbiológica durante o traslado para o laboratório. Fonte: O autor, 2020.

3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Após a coleta, as amostras biológicas das úlceras presentes nos tubos com meio Stuart e swab foram processadas. Para isso, o material contido na extremidade de cada swab foi introduzido em tubo de ensaio de vidro esterilizado previamente por autoclavagem contendo 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Posteriormente, cada suspensão foi homogeneizada

por 30 segundos em agitador vórtex (Labnet, EUA). A partir deste material, foi realizada uma diluição de 1:10 para propiciar uma contagem mais assertiva das unidades formadoras de colônia. Para isso, adicionaram-se 100 µL deste conteúdo em 900 µL de solução salina. A partir desta suspensão, realizou-se a semeadura de alíquotas de volume de 100 µL em cada uma das três placas de meio de cultura (Ágar Sangue, Ágar MacConkey e Ágar manitol) conforme representado no quadro 2. Posteriormente, a alíquota foi espalhada utilizando a técnica de superfície com auxílio de alça de Drigalsky de vidro até absorção completa pelo meio de cultura e, logo após, as placas de meio de cultura foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em condições de aerobiose. As contagens foram realizadas a olho desarmado e, em seguida, aplicou-se o fator de correção⁶⁰ 1:10, expressando, assim, seu resultado em UFC/mL (Unidade Formadora de colônia por Mililitro) (BRITO, 2000; GUERRA, 2016).

Quadro 2. Meios de cultura e provas bioquímicas para identificação microbiológica. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2004.

PROVAS E MEIOS DE CULTURA				
AGAR			PROVAS	
SANGUE	MACCONKEY	MANITOL	CATALASE	RUGAI COM LISINA
Meio de cultura não seletivo usado para o isolamento de microrganismos não fastidiosos ⁶¹ .	Meio de cultura para isolar bacilos gram negativos	Meio de cultura para diferenciação de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Diferenciar grupos de <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> (Figura 3.4) através da presença da enzima catalase decompondo peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em água e oxigênio.	Identificar família <i>Enterobacteriaceae</i> . São considerados atualmente 27 gêneros, 102 espécies e 8 grupos indefinidos.

A enzima catalase é uma enzima oxidorreductase e desempenha um papel crucial para neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) como peróxido de hidrogênio, molécula frequentemente produzida como um subproduto da respiração aeróbica. Portanto, a enzima

⁶⁰ Método utilizado para corrigir a diluição microbiana, princípio ativo, o teor elementar de um mineral ou a umidade [ANFARMAG, 201?].

⁶¹ Microrganismo com exigências nutritivas complexas, não desenvolvendo-se em meios de cultura não seletivos. Multiplicam-se lentamente, exigem altos lotes de suplemento nutritivo e de controle ambiental (SIMMONS, 2019).

catalase atua como um antioxidante e protege a célula contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Essa enzima é encontrada em uma ampla gama de organismos aeróbios e anaeróbios e hidrolisa mais de um milhão de moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo. O mecanismo básico de funcionamento desta enzima envolve a degradação da espécie reativa de oxigênio, ou seja, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água ($2 H_2O_2 + \text{Catalase} \rightarrow 2 H_2O + O_2$). Essa reação é evidente e demonstrada pela rápida formação de bolhas (KAUSHAL, 2018). Desta forma, o teste de catalase facilita a detecção da enzima catalase em bactérias Gram + (REINER, 2010).

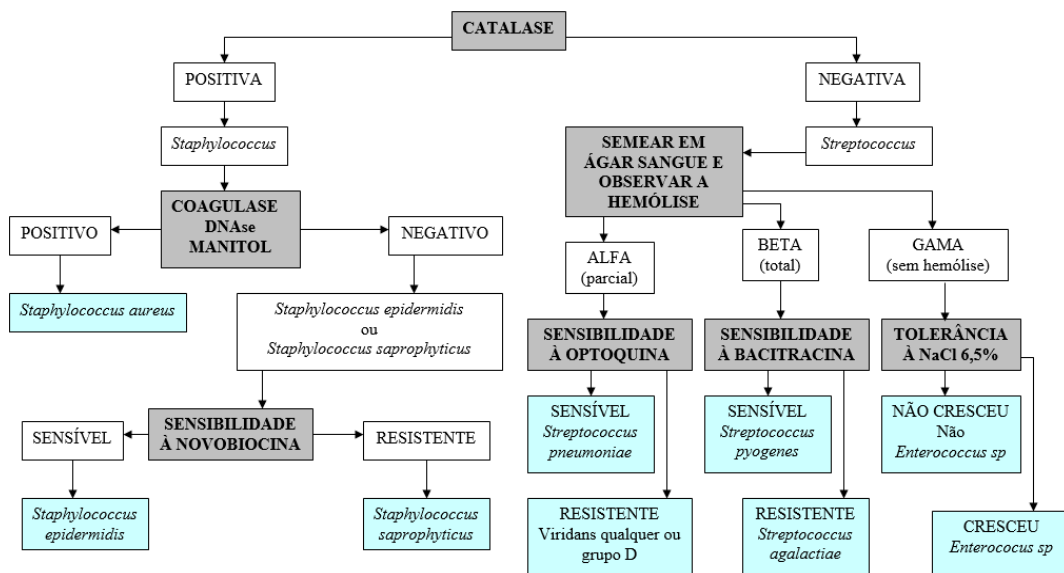


Figura 20. – Prova da catalase – Fluxograma para identificação diferencial de bactérias Gram +. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2004.

Para a prova da catalase foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em um tubo de ensaio de 12 x 75 mm. Usando um swab, foi coletada uma pequena quantidade de microrganismos diretamente das colônias formadas no meio de cultura e colocada dentro do tubo. As reações positivas foram evidentes por efervescência imediata ($O_2 + \text{água} = \text{bolhas}$) (Figura 21 A). Já nas reações negativas sem enzima catalase para hidrolisar o peróxido de hidrogênio, não houve formação de bolhas (Figura 21 B) (REINER, 2010).

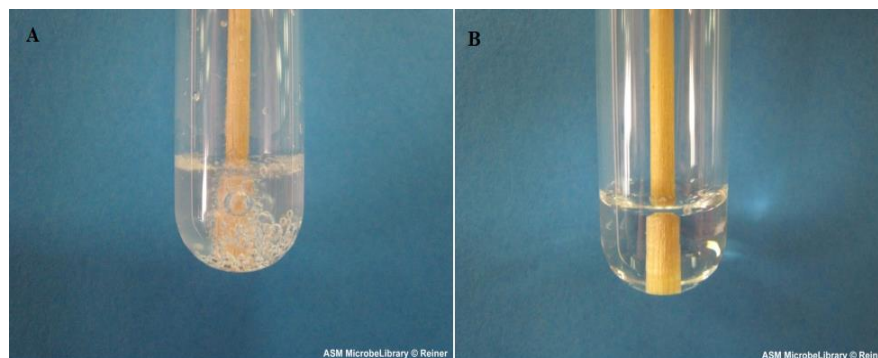


Figura 21. – Prova da catalase – A) reação positiva: evidentes por efervescência imediata ($O_2 + \text{água} = \text{bolhas}$). B) reação negativa, sem formação de bolhas. Fonte: REINER, 2010.

Adicionalmente, foi utilizado o meio de cultura Rugai com Lisina, visto que é possível se analisar a presença de diferentes reações enzimáticas, formação de gás e capacidade de motilidade em um único tubo (Figura 22). Com isso, é possível diferenciar cepas de cocos Gram – da família *Enterobacteriaceae*⁶². As amostras foram inoculadas em meio de cultura, através da técnica de semeadura das colônias em profundidade e estriamento da superfície em tubo inclinado. Posteriormente, as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, com a tampa frouxa e com duas gotas do reativo de Kovacs⁶³ (PACHECO, 2020).

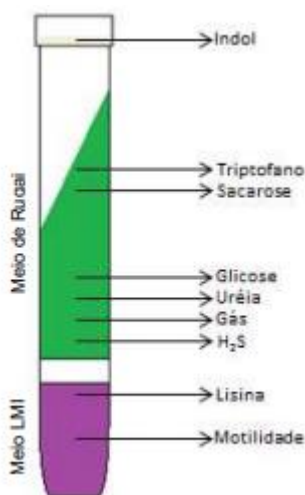


Figura 22 – Tubo Rugai com lisina – meio de cultura utilizado para identificar família *Enterobacteriaceae*. Apresentação das porções onde ocorrem as reações bioquímicas. Fonte: LABOCLIN, 2019

⁶² Família de bactérias Gram – anaeróbicas facultativas e em forma de bastonete, que não formam endósporos, alguns sendo saprófitas e outros parasitas de plantas e animais (DeCS,2019)

⁶³ Solução contendo p-Dimetilaminobenzaldeído 5%, Ácido clorídrico 25% e Butanol q.s.p.,utilizada para realizar a prova do Indol (IND). (LABOCLIN, 2019).

O objetivo de se usar o meio de Rugai com lisina consiste em realizar uma triagem bioquímica de colônias bacterianas. O meio de Rugai com Lisina apresenta uma série bioquímica contendo nove provas que são agrupadas em um único tubo sendo elas: (1) reação de indol (IND), (2) desaminação do aminoácido L-triptofano (LTD), (3) fermentação da sacarose (SAC), (4) produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), (5) produção de gás (GAS), (6) hidrólise da ureia (URE), (7) fermentação da glicose (GLI), (8) descarboxilação da lisina (LIS) e (9) motilidade (MOT), sendo analisadas visualmente conforme representação na Figura 23 (LABOCLIN, 2019).

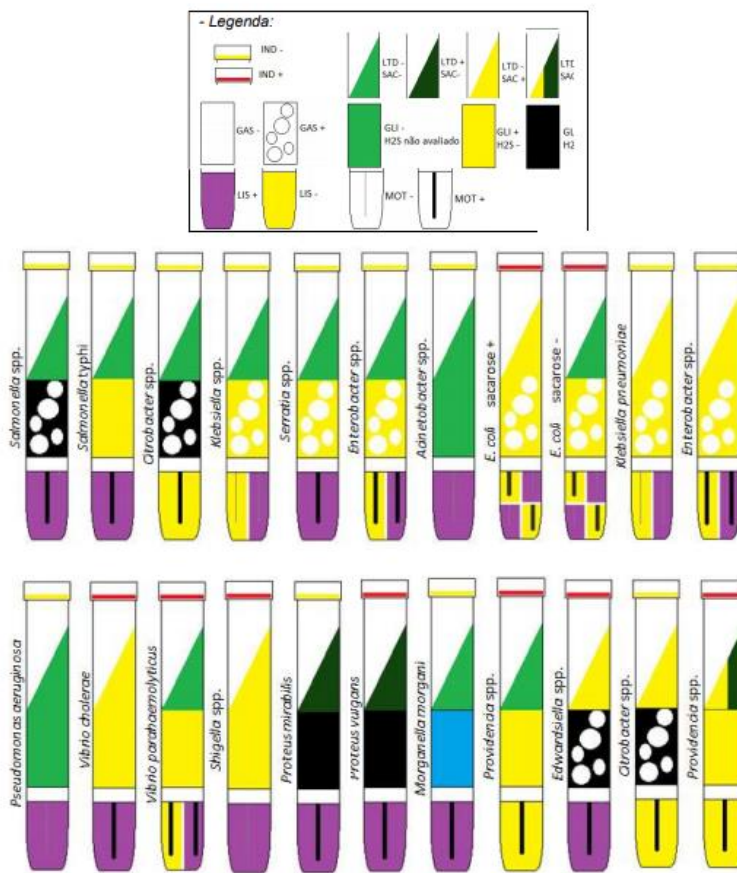


Figura 23 – Resultados visuais do meio de cultura Rugai com lisina – representação dos resultados esperados para identificação de bactérias. Fonte: LABOCLIN, 2019.

4. RESULTADOS

4.1 RELAÇÃO DA EVOLUÇÃO DAS FERIDAS E MICROBIOTA

Após a realização das identificações bacterianas, observou-se que a maioria das bactérias encontradas nas úlceras dos participantes de pesquisa foram Gram + com prevalência em 79,3% (Figura 24). Essas bactérias são consideradas comensais da pele da maioria dos indivíduos expostos ao ambiente hospitalar (OTTO, 2009). Entretanto, as bactérias Gram – as quais são enterobactérias representaram 20,7%.

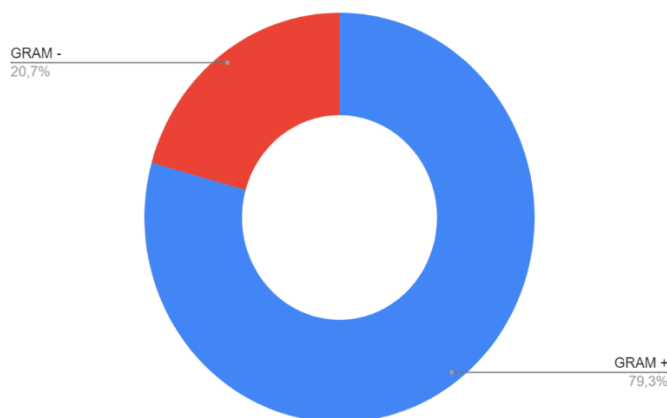


Figura 24. Prevalência geral de bactérias Gram + versus bactérias Gram -: amostras bacterianas coletadas diretamente da úlcera dos participantes de pesquisa dos seguintes grupos: grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2), durante os dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22) e D45 (Dia 45) de tratamento.

Cerca de 79% das espécies microbianas identificadas nas úlceras dos participantes de pesquisa eram bactérias comensais que são normalmente encontradas em indivíduos expostos ao ambiente hospitalar (*S. aureus* 39,7% e *S. epidermidis* 39,7%).

O restante percentual, 20,7% de espécies microbianas encontradas nas úlceras, foram *Edwardsiella* spp. (10,3%), *Klebsiella* spp. (5,2%) e *P. mirabilis* (5,2%) (Figura 25). Essas espécies não fazem parte da microbiota comensal do tecido cutâneo humano, e são potencialmente patogênicas (LEUNG,2012).

Todas as espécies bacterianas demonstraram colonização persistente não apresentando diferença significativa na microbiota da úlcera após os tratamentos em quaisquer dos grupos supracitados: GC, GE1 e GE2.

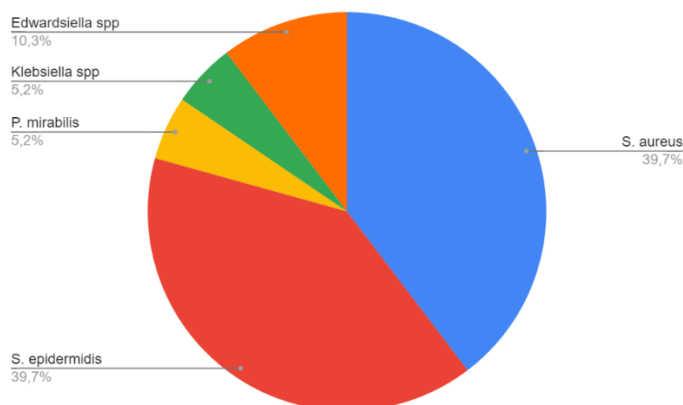


Figura 25 – Prevalência de espécies microbianas: amostras bacterianas coletadas diretamente da UPD dos participantes de pesquisa dos seguintes grupos: grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2), durante os dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22) e D45 (Dia 45) de tratamento.

Realizaram-se coletas das amostras biológicas em dois momentos, sendo: (1) Coleta Inicial (CI) ao retirar o curativo, antes de iniciar o protocolo e (2) a Coleta Final (CF) ao término do protocolo. A variação bacteriana será apresentada em porcentagem. Para identificação dos participantes de pesquisa, utilizou-se um código de identificação, em que P1 representa participante nº1 e P2 representa participante nº2, assim por diante. A seguir, serão descritos os resultados do representante de cada um dos grupos.

O participante P12, representando o GC (Figura 26) em seu período de tratamento, notou-se que no D0 houve um aumento de 7% na microbiota. Já no D22 houve uma diminuição em 26% dos microrganismos. No último dia do tratamento, no D45, houve redução de 90%. Em todas as análises houve manutenção do perfil microbiológico apresentando diminuição média de 36% de bactérias totais. Tendo sua colonização por *S. epidermidis* e *Klebsiella spp*. Contudo, observou-se involução na cicatrização da úlcera, apresentando aumento em 34% (SANTANA,2021).



Figura 26 – Registro fotográfico dos dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22), e D45 (Dia 45) do representante do grupo controle (GC).

Já o participante P1 pertencente ao GE1, que apresentava seu tendão calcâneo quase totalmente exposto, apresentou contração da ferida em 47% (SANTANA,2021) conforme podemos observar na Figura 27, dentro dos 45 dias do experimento. Todavia, observaram-se variações na quantidade de cepas de *S. epidermidis* e *S. aureus* na úlcera deste participante ao longo do tratamento. No D0, notou-se uma diminuição de 89% seguida de redução de 7% no dia 22. Contudo, no D45, notou-se um aumento em 40% de sua microbiota. Demonstrando assim uma diminuição média de sua microbiota total em 56%.

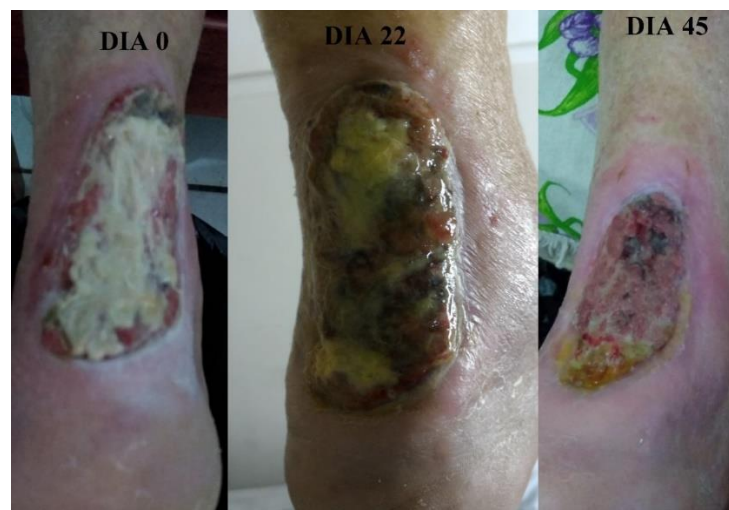


Figura 27– Registro fotográfico dos dias D0 (Dia 0), D22 (Dia 22), e D45 (Dia 45) da representante do grupo experimental 1 (GE1) tratado com biomembrana de látex natural (BLN) + LED (RAPHA®).

A participante P9 pertencente ao grupo GE2 teve sua úlcera 100% cicatrizada em apenas 33 dias (SANTANA,2021). Devido a isso, não se seguiu o protocolo de análise padrão, ou seja, coleta nos dias 0, 22 e 45. Ao analisar a microbiota de sua úlcera, observou-se uma variação significativa de *S. epidermidis* (Figura 28). No dia inicial (D0) de aplicação do protocolo terapêutico, observou-se redução de cerca de 82% da quantidade de *S. epidermidis* após a

aplicação do protocolo RAPH^A® plus. Já no dia 17, averiguou-se um aumento de 2% na quantidade de *S. epidermidis* e no dia 33 notou-se aumento de 136% da população microbiana. Apresentando aumento médio de sua microbiota cultivável em 56%.



Figura 28 – Registro fotográfico dos dias D0 (Dia 0), D17 (Dia 17), e D33 (Dia 33) da representante do grupo experimental 2 (GE2) tratado com biomembrana de látex natural (BLN) veiculada com lipossomas de curcumina + LED (RAPH^A® Plus).

A fim de demonstrar a variação na população bacteriana cultivável, foram produzidas tabelas demonstrando a variação em porcentagem geral de todos os participantes de pesquisa nos diferentes grupos (Figura 29) e a variação em porcentagem por espécie microbiana (Apêndice C). Os números representados nas colunas porcentagem (%) de Variação e porcentagem (%) MÉDIA, quando se apresentam negativos, demonstram diminuição da microbiota após os devidos protocolos que serão apresentados em fonte vermelha. Os números positivos evidenciam um aumento na microbiota da UPD e permanecem em fonte preto automático.

A DIA 0				B DIA 22				C DIA 45			
Participante	Grupo	% de Variação	% MÉDIA	Participante	Grupo	% de Variação	% MÉDIA	Participante	Grupo	% de Variação	% MÉDIA
P1	GE1	-89%	-4%	P1	GE1	-7%	25%	P1	GE1	40%	-21%
P2	GE1	-23%		P2	GE1	238%		P2	GE1	-35%	
P3	GE1	-7%		P3	GE1	-24%		P3	GE1	-9%	
P4	GE1	-18%		P4	GE1	-9%		P4	GE1	-30%	
P5	GE1	116%		P5	GE1	-76%		P5	GE1	-70%	
P6	GE2	-5%	-27%	P6	GE2	-89%	-22%	P6	GE2	-57%	9%
P8	GE2	23%		P8	GE2	25%		P8	GE2	-26%	
P9	GE2	-82%		P9	GE2	2%		P9	GE2	137%	
P14	GE2	-29%		P14	GE2	-34%		P14	GE2	-30%	
P15	GE2	-43%		P15	GE2	-12%		P15	GE2	23%	
P10	GC	50%	31%	P10	GC	-58%	14%	P10	GC	-53%	-39%
P11	GC	-6%		P11	GC	-9%		P11	GC	-12%	
P12	GC	7%		P12	GC	-26%		P12	GC	-90%	
P13	GC	121%		P13	GC	188%		P13	GC	-22%	
P7	GC	-15%		P7	GC	-26%		P7	GC	-18%	

Figura 29 – Variação bacteriana entre a Coleta Inicial (CI) - ao retirar o curativo e antes de iniciar os protocolos (1) padrão do SUS (GC), (2) protocolo RAPHA® (GE1) e (3) protocolo RAPHA® Plus (GE2) e a Coleta Final (CF) - logo após ao término desses procedimentos e antes do fechamento do novo curativo do dia inicial D0 (A), dia intermediário D22 (B) e do dia derradeiro D45 (C) - os números representados nas colunas % de Variação e % MÉDIA quando se apresentam negativos demonstram diminuição da microbiota após os devidos protocolos e serão apresentados em fonte vermelha. Os números positivos evidenciam um aumento na microbiota da UPD e os números permanecem em fonte preto automático.

4.2 ANÁLISE DE DADOS

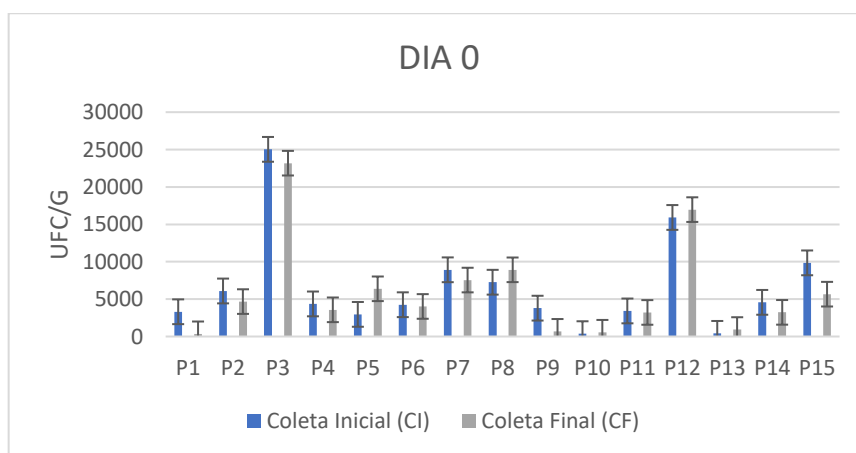
Para avaliar a população microbiana, este estudo adotou uma abordagem em dias, isto é, foi realizada uma coleta com swab nos dias 0, 22 e 45 dos tratamentos realizados. Isto serviu para observar como se comportava a população microbiana nas úlceras de pé diabético.

Por ser uma pesquisa em que o tamanho da amostra é demasiadamente pequeno, ou seja, foram 15 participantes da pesquisa, a análise estatística realizada foi de testes não paramétricos, não necessitando de utilização do teste de normalidade. (WARNER, 2007)

Dessa maneira, para analisar amostras não-paramétricas dependentes num mesmo grupo de tratamento em momentos diferentes, realizou-se o teste de Wilcoxon, com o Programa IBM SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*. (Apendice B)

O resultado para análise de comparação de médias com a intervenção no GC, com o padrão SUS, e no grupo GE1 e GE2 utilizando o tratamento RAPHA® e RAPHA® Plus, nos dias 0, 22 e 45, respectivamente, para verificar se eram significativamente diferentes entre si ($p < 0,050$). Concluiu-se que não houve diferença nas médias calculadas nos dias avaliados.

Abaixo seguem os gráficos em colunas, indicando números absolutos da contagem microbiana global dos quinze participantes de pesquisa. Não se observou diferença estatística entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) entre os participantes de pesquisa.



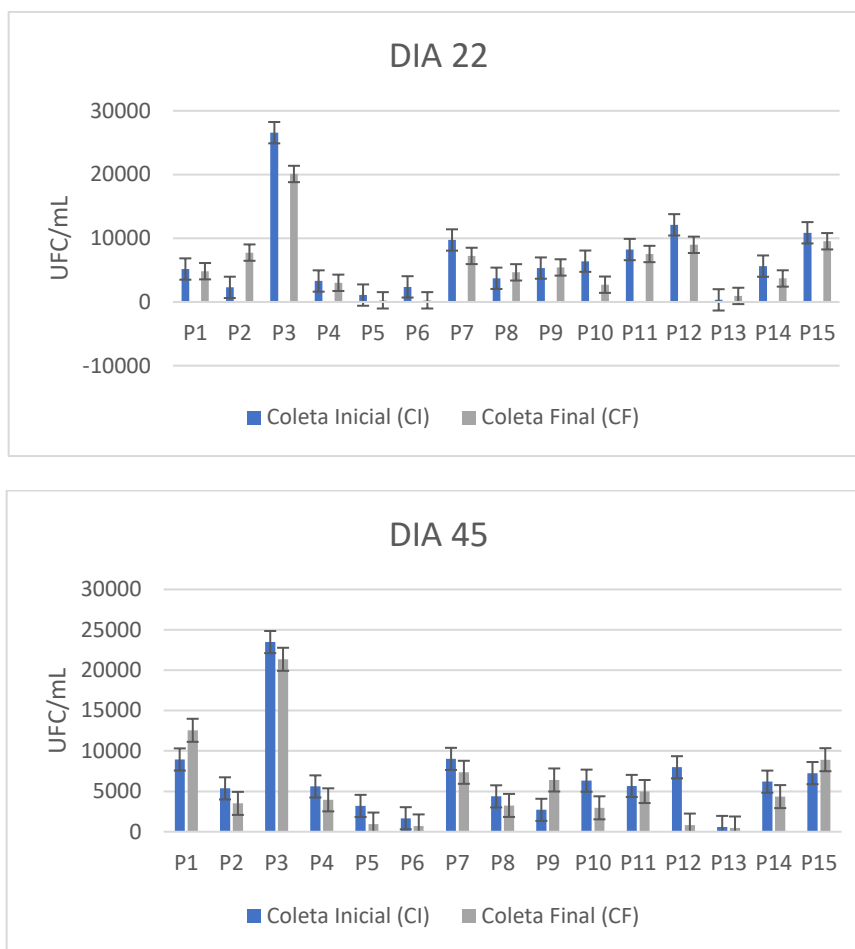


Figura 30 – Números absolutos da contagem microbiana (tendo como unidade de medida UFC/mL) global dos participantes de pesquisa alocadas nos grupos Grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2) nos dias D0, D22 e D45. Amostras coletadas em dois momentos: (1) Coleta Inicial (CI) ao retirar o curativo e antes de iniciar os protocolos e (2) Coleta Final (CF) logo após ao término desses procedimentos e antes do fechamento do novo curativo.

Utilizou-se o gráfico do tipo Boxplot que nos fornece dentro do tamanho da amostra números significativamente discrepantes, mas nos fornece uma amostra mediana dos primeiros, segundo e terceiro quartil⁶⁶, que em suas extremidades contém o mínimo e máximo, desconsiderando também *outliers*⁶⁷. Nas figuras abaixo, demonstra-se os resultados das amostras coletadas nos dias D0, D22 e D45 por grupo GC, GE1 e GE2.

⁶⁶ Diz-se de ou qualquer das separatrizes que dividam uma série ordenada de observações em quatro partes. Valores máximos, os mínimos, a mediana, o primeiro quartil e o terceiro quartil. (MICHAELIS, 2021; GALVANI, 2012).

⁶⁷ É uma observação que se desvia tanto de outras observações que levantem suspeitas de que foi gerado por um mecanismo diferente (HAWKINS, 1980).

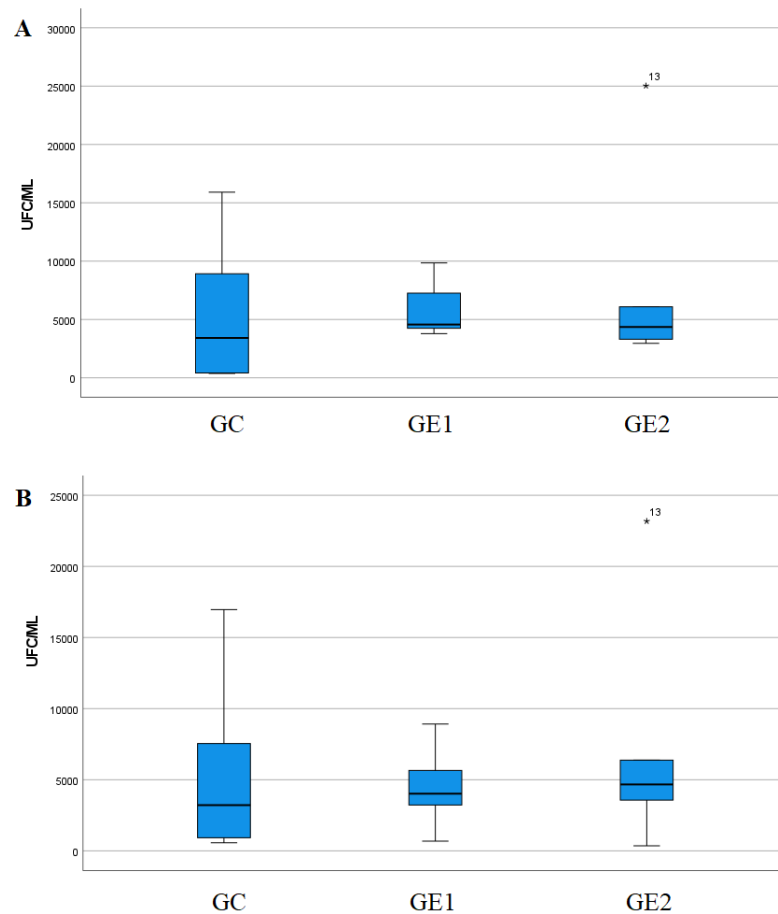
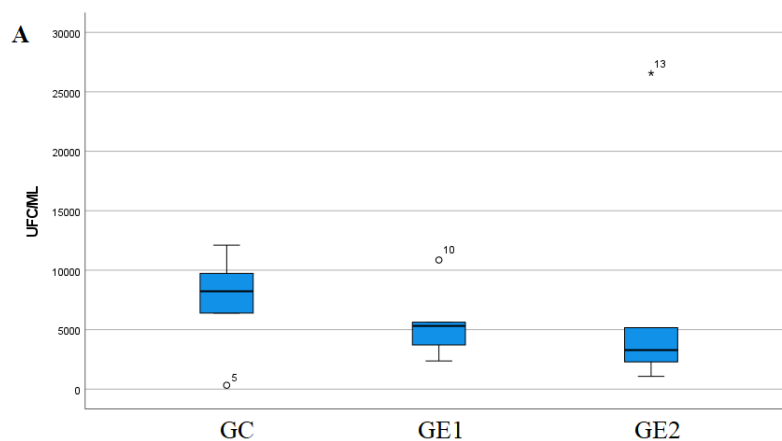


Figura 31. – Resultado das amostras coletadas no dia D0 por grupo. (A) Coleta Inicial (CI) e (B) Coleta Final (CF) no dia 0. Grupo Controle (GC) seguindo o tratamento SUS, Grupo Experimental 1 (GE1) com tratamento RAPHA® e Grupo Experimental 2 (GE2) tratamento RAPHA® Plus. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon para amostras dependentes, o resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,156. Demonstrando, portanto, que não há diferença significativa.



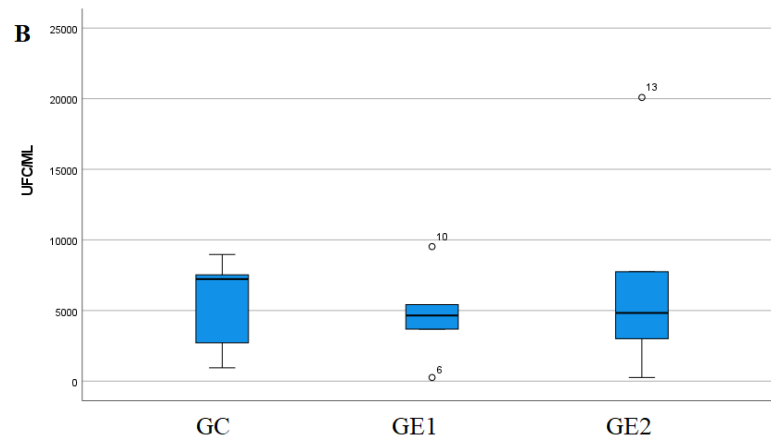


Figura 32 – Resultado das amostras coletadas no dia D22 por grupo. (A) Coleta Inicial (CI) e (B) Coleta Final (CF) no dia 0. Grupo Controle (GC) seguindo o tratamento SUS, Grupo Experimental 1 (GE1) com tratamento RAPHA® e Grupo Experimental 2 (GE2) tratamento RAPHA® Plus. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon para amostras dependentes, o resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,053. Demonstrando, portanto, que não há diferença significativa.

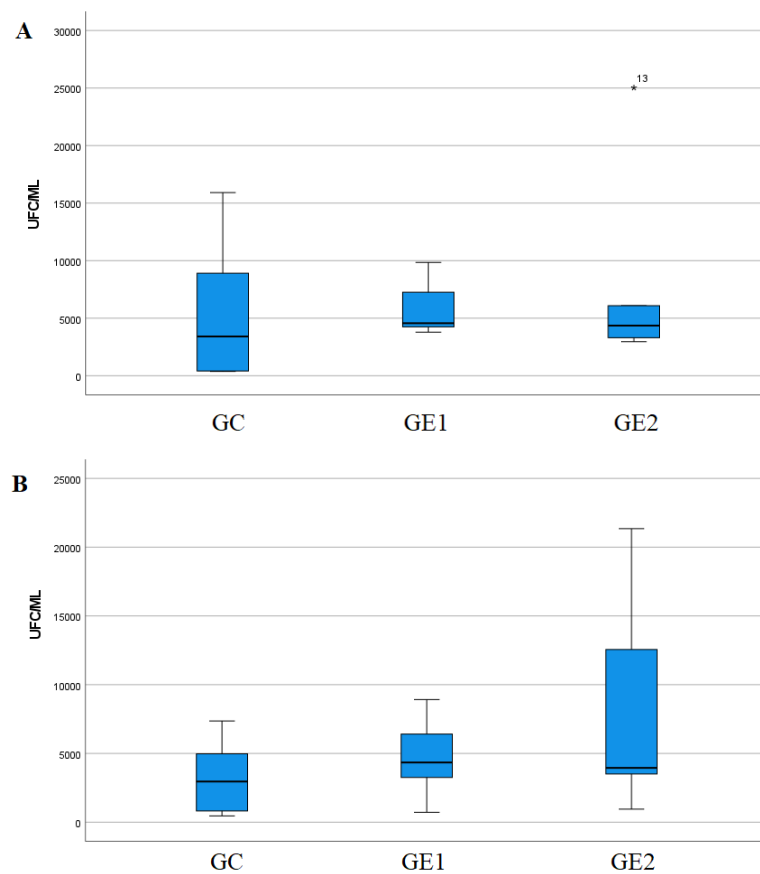


Figura 33– Resultado das amostras coletadas no dia D45 por grupo. (A) Coleta Inicial (CI) e (B) Coleta Final (CF) no dia 0. Grupo Controle (GC) seguindo o tratamento SUS, Grupo Experimental 1 (GE1) com tratamento RAPHA® e Grupo Experimental 2 (GE2) tratamento RAPHA® Plus. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon para amostras dependentes, o resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,125. Demonstrando, portanto, que não há diferença significativa.

4.2.1 PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DA UNIVERSIDADE DE TEXAS.

Para se realizar uma apreciação acurada do tipo de ferida predominante nesse ensaio clínico, resolveu-se uniformizar a amostra para mais uma análise estatística. Os tipos de ferida foram padronizados pelas amostras biológicas das lesões Tipo “A”, segundo a classificação da Universidade de Texas, com ausência de infecção ou isquemia e crescimento microbiológico em ágar Manitol. Dessa forma, excluíram-se 8 participantes do estudo.

A hipótese deste estudo é observar se o protocolo RAPHA® ou RAPHA® Plus possuem atividade antimicrobiana. Utilizou-se a análise de variância ANOVA (Apêndice A), pois o intuito foi comparar a média de população amostral com úlceras similares, além de descobrir se houve médias distintas significativamente entre elas, similar ao teste de hipóteses. A significância atribuída a p-valor <0,05. O resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,9119, sem diferença significativa estatística entre os dias e os tratamentos, nos tipos de feridas “A”, conforme classificação de Texas, como se observa no gráfico de barra abaixo.

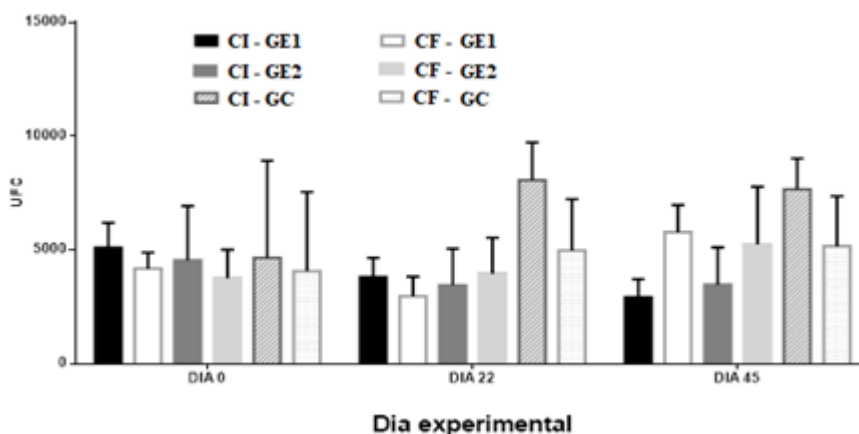


Figura 34 - Gráfico de barras onde é apresentado quantitativamente as UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL) entre a Coleta Inicial (CI) - ao retirar o curativo e antes de iniciar os protocolos (1) padrão do SUS (GC), (2) protocolo RAPHA® (GE1) e (3) protocolo RAPHA® Plus (GE2) e a Coleta Final (CF) - logo após ao término desses procedimentos e antes do fechamento do novo curativo nos dias experimentais D0, D22 e D45. Significância atribuída a p-valor <0,05. Análise estatística realizada pela análise de variância ANOVA, o resultado de significância apresentado foi de p-valor 0,9119. Demonstrando, pois, que não há diferença significativa.

Por similaridade do objeto estudado, utilizou-se esse tipo de gráfico com o seu desvio padrão, e concluiu-se que não houve alteração na microbiota cutânea da UPD mesmo após os tratamentos GC, GE1 e GE2.

5. DISCUSSÃO

A *Diabetes mellitus* é um dos maiores problemas de saúde mundial tendo diversas complicações, dentre elas, há o desenvolvimento de úlcera nos membros inferiores (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005). As úlceras podológicas possuem microbiota residente⁷⁰ superficial, mantendo relação de comensalismo. Porém o domicílio e o ambiente nosocomial podem proporcionar contato com bactérias transitórias⁷¹ oferecendo local adequado para colonização. A colonização não é equivalente à infecção, pois infecção é definida quando a contagem microbiana é igual ou maior que 10^5 UFC/mL (LEITE, 2011; PATIÑO, 2013; CARDOSO, 2018). Além disso é importante salientar que os microrganismos exercem um importante papel na resposta imunológica, inclusive a composição da microbiota pode variar com a periodicidade da limpeza local (PATIÑO, 2013). Entretanto, sugere-se que a contração de feridas é acelerada na ausência de microbiota comensal (CANESSO, 2014).

Neste trabalho, averiguou-se a população microbiana nas amostras coletadas em úlcera de membros inferiores dos participantes de pesquisa, através de ensaios bioquímicos e microbiológicos. As coletas foram realizadas em dois momentos distintos sendo: (1) Coleta Inicial (CI) ao retirar o curativo e antes de iniciar o protocolo e (2) a Coleta Final (CF) ao término do protocolo e antes do fechamento do novo curativo.

De acordo com classificação inicial preconizada por Hans Christian Gram em 1884, observou-se a prevalência geral de bactérias Gram + versus bactérias Gram – (Figura 4). Onde 79,3% das bactérias eram Gram + (*S. aureus* 39,7% e *S. epidermidis* 39,7%) e 20,7%, de espécies microbianas encontradas nas úlceras foram (*Edwardsiella* spp. 10,3%, *Klebsiella* spp. 5,2% e *P. mirabilis* 5,2%) (Figura 4.1). Entrando em consonância com as literaturas onde isolaram microrganismos de UPD (NOOR, 2015; CARVALHO et al, 2004).

⁷⁰ Microbiota aderida as camadas mais profundas da epiderme, resistente a remoção com água e sabão. Normalmente não causam infecções (CARDOSO, 2018).

⁷¹ Microrganismos que raramente se desenvolvem no tecido cutâneo, sendo elas patogênicas ou não (CARDOSO, 2018).

A eliminação de algumas cepas como o *S. epidermidis* podem favorecer a colonização por patógenos oportunistas (PATIÑO, 2013). Outro gênero bacteriano auxiliar na homeostase da ferida é o *Lactobacillus* spp, pois, graças a sua produção de ácido láctico, promove uma diminuição do pH da UPD dificultando a colonização de patógenos oportunistas. Além disso os *Lactobacillus* expressam a quimiocina CXCL12, responsável por acelerar o fechamento e a melhora da ferida em camundongos com hiperglicemia ou isquemia periférica, condições associadas a feridas crônicas (GUYON, 2014).

Em todos os dias de tratamento nos diferentes grupos, demonstra-nos que houve oscilações quantitativas da microbiota de UPD. Porém, a diminuição bacteriana não trouxe benefícios para a contração da ferida. Por exemplo, o participante P12 (GC) teve aumento médio em sua microbiota em 36%, contudo não houve contração da ferida, ao contrário, houve aumento em 34% de sua úlcera. O participante P1 (GE1) demonstrou diminuição média de sua população microbiana em 19%, entretanto sua ferida apresentou 47% de contração. Já a participante P9 (GE2) teve 100% de sua UPD cicatrizada em apenas 33 dias e notou-se que teve o maior aumento de 56% na população microbiana. Essas incongruências relacionadas à cicatrização e a microbiota ainda carecem de novos estudos.

Quanto ao potencial de contração da ferida, Santana (2021, p.67-88) em seu estudo relata a superioridade do tratamento realizado com o RAPHIA® Plus, pois este apresentou contração média nos participantes de pesquisa em 89,6%. Os participantes tratados com RAPHIA® apresentaram contração média em 40,8%, por fim, os participantes que foram submetidos ao protocolo padrão SUS, tiveram contração média de apenas 22%. Demonstrando, portanto, que a tecnologia RAPHIA® é uma ferramenta promissora para a cicatrização de úlceras de membros inferiores que acometem o diabético.

A limitação deste estudo foi a não observação de diferença estatística na população microbiana cultivável em nenhum dos grupos analisados. Entretanto há necessidade de compreender melhor o comportamento da microbiota comensal da pele, na regulação e contração da ferida, pois nos chama atenção em especial à participante P9 que teve sua cicatrização em apenas 33 dias e teve também um dos maiores aumento médio de sua microbiota cultivável, aumentando em 56% *S. epidermidis*. Essa cepa bacteriana é comensal da pele, e possivelmente ofereceu ao hospedeiro o benefício de não permitir colonização de cepas transitórias na ferida.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O protocolo terapêutico consistiu na utilização de irradiação de LEDterapia (com comprimento de onda vermelho) por 35 min associado à biomembrana de látex natural (RAPHA®) contendo ou não lipossomas de curcumina durante os 45 dias de ensaio. Observou-se que este tratamento não induziu resposta antimicrobiana. Ao contrário, em alguns casos houve aumento na quantidade de bactérias cultiváveis, inclusive em indivíduos com cicatrização plena. Os grupos experimentais GE1 e GE2 demonstraram uma neoformação tecidual superior comparado com o grupo controle (GC).

Sugerem-se novos estudos para compreender a influência do equipamento RAPHA® na microbiota da UPD, como por exemplo, a análise metagenômica. É também salutar utilizar outros comprimentos de onda avaliando se há alguma alteração significativa na população microbiana. Uma alternativa seria investigar se ainda caberia ao projeto RAPHA® um terceiro agente para que pudesse auxiliar a simbiose cutânea e exclusão de cepas patogênicas, facilitando ainda mais a cicatrização plena.

7. REFERÊNCIAS

ANFARMAG, Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais. **Quando e Como Aplicar Fator de Correção de Umidade e Fator de Equivalência**. 2017. Disponível em: <https://www.anfarmag.org.br/files/editor/files/arquivos/link.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2021.

AGGARWAL, Bharat B.; HARIKUMAR, Kuzhuvilil B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 41, n. 1, p. 40-59, 2009.

AGNELLO, R. C. S. et al. The use of phototherapy for healing treatments: study of new techniques for tissue neof ormation. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access*, v. 4, n. 1, p. 1-2, 2018. Nunes, G. A. M. D. A., Reis, M. D. C. D., Rosa, M. F. F., Peixoto, L. R.

AKBIK, Dania et al. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sciences*, [s.l.], v. 116, n. 1, p.1-7, out. 2014.

AKRAM, M. et al. Curcuma longa and curcumin: a review article. *Rom J Biol Plant Biol*, v. 55, n. 2, p. 65-70, 2010.

ALAM, Uazman et al. General aspects of diabetes mellitus. *Diabetes And The Nervous System*, [s.l.], p.211-222, 2014.

ALHARBI, Naiyf S. et al. Prevalence of Escherichia coli strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk. *Saudi journal of biological sciences*, v. 26, n. 7, p. 1557-1562, 2019.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, [s.l.], v. 28, n.S37, p.S5-S10, 1 jan. 2005.]

ARMBRUSTER, Chelsie E.; MOBLEY, Harry LT; PEARSON, Melanie M. Pathogenesis of Proteus mirabilis infection. *EcoSal Plus*, v. 8, n. 1, 2018.

AZEVEDO, João Lúcio. Microrganismos endofíticos. *Ecologia microbiana*, p. 117-137, 1998.

BALTZIS, Dimitrios; ELEFTHERIADOU, Ioanna; VEVES, Aristidis. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Advances In Therapy*, [s.l.], v. 31, n. 8, p.817-836, 29 jul. 2014.

BANDY, Altaf. Ringing bells: Morganella morganii fights for recognition. *Public health*, v. 182, p. 45-50, 2020.

BORINI, Júlio Cesar et al. Protocolo de verificação do processo de esterilização por vapor de formaldeído. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasília, 2004

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário nacional da farmacopeia brasileira. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica., Manual do pé diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica /

Diabetic foot manual: strategies for the care of the person with chronic disease., Brasília, 2016.

BRASIL. Resolução RDC nº 3.012 de 1 de dezembro de 2009. Aprova "*Regulamento Técnico Mercosul para Produtos com Ação Antimicrobiana Utilizados em Artigos Críticos e Semi-críticos, Áreas Críticas e Semi-Críticas e Esterilizantes*" Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt3012_01_12_2009.html> acesso em 24/06/2021

BRITO, José Renaldi Feitosa; BRITO, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva; VERNEQUE, Rui da Silva. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Ciência rural*, v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.

CAMPANHÃ, Myriam Therezinha Neves. Interações entre vesículas catiônicas e superfícies biológicas: lipossomos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) como agentes antimicrobianos. 2000. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CANESSO, Maria Cecilia Campos. Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas em animais isentos de microbiota comensal. 2014.

CARR, Janice Haney Carr, 2001. Disponível em <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=11153>> Acesso 11/01/2021

CARVALHO, Cibele et al. Diabetic foot infection: bacteriologic analysis of 141 patients. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 48, n. 3, p. 406-413, 2004

DAI, Xinyi et al. Nano-formulated curcumin accelerates acute wound healing through Dkk-1-mediated fibroblast mobilization and MCP-1-mediated anti-inflammation. *Npg Asia Materials*, [s.l.], v. 9, n. 3, p.368-368, mar. 2017

DE ABREU CHAVES, Maria Emília. Avaliação dos efeitos clínicos da fototerapia em úlceras venosas. *Fisioterapia Brasil*, v. 10, n. 3, p. 215-219, 2017.

DE LIMA, Fernando José Camello; BARBOSA, Fabiano Timbó; DE SOUSA-RODRIGUES, Célio Fernando. Use alone or in combination of red and infrared laser in skin wounds. *Journal of lasers in medical sciences*, v. 5, n. 2, p. 51, 2014.

DE SOUZA, Maria Gorete Mendes et al. ent-Copallic acid antibacterial and anti-biofilm properties against *Actinomyces naeslundii* and *Peptostreptococcus anaerobius*. *Anaerobe*, v. 52, p. 43-49, 2018.

Descritores em Ciências da Saúde: DeCS. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2008. Disponível em: <https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=11812&filter=ths_termall&q=PROGNOSTICO>. 21 de fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2006. Disponível em: <https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=24758&filter=ths_termall&q=queratin*>. 21 de fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2018. Disponível em: <https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=28903&filter=ths_termall&q=citocina> 21 de fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2016. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=7297&filter=ths_termall&q=imunidade%20inata >
21 de fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2003. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=24247&filter=ths_termall&q=lisozi* > 21 de fev.
2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2016. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=13954&filter=ths_termall&q=simbiose > 21 de fev.
2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2016. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=2397&filter=ths_termall&q=assintom%C3%A1tico
> 21 de fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2016. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=13954&filter=ths_termall&q=mutualismo > 21 de
fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2016. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=13954&filter=ths_termall&q=comensal* > 21 de
fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 1988. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=19278&filter=ths_termall&q=oportunista > 21 de
fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2018. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=32342&filter=ths_termall&q=biofilm> 21 de fev.
2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2003. Disponível em: <
[https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=36513&filter=ths_termall&q=f%C3%A1scia%20su
bcut%C3%A2nea](https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=36513&filter=ths_termall&q=f%C3%A1scia%20subcut%C3%A2nea) > 21 de fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2016. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=874&filter=ths_termall&q=hip%C3%B3xia > 21 de
fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2017. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=23414&filter=ths_termall&q=Peptideoglicano > 21
de fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2008. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=15176&filter=ths_termall&q=virulen* > 21 de fev.
2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2017. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=28477&filter=ths_termall&q=nosocomia*> 21 de
fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2009. Disponível em:
<https://decs.bvsalud.org/th/resource/?id=4806&filter=ths_termall&q=Endosporo > 21 de
fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2020. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=32031&filter=ths_termall&q=septicemia> 21 de
fev. 2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2020. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=59546&filter=ths_termall&q=zoonose> 21 de fev.
2021.

_____. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2006. Disponível em: <
https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=50591&filter=ths_termall&q=COX-2> 09 de jul.
2021

DIEGELMANN, Robert F.; EVANS, Melissa C.. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers In Bioscience*, Richmond, v. 9, n. 9, p.283-289, jan. 2004.

DONG, Jianfei; XIONG, Daxi. Applications of light emitting diodes in health care. *Annals of biomedical engineering*, v. 45, n. 11, p. 2509-2523, 2017.

DUMVILLE, J. C. et al. Systematic review and mixed treatment comparison: dressings to heal diabetic foot ulcers. *Diabetologia*, [s.l.], v. 55, n. 7, p.1902-1910, 29 abr. 2012.

DU, Meng et al. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 4, p. 1349-1354, 2007.

EMIROGLU, Gokhan et al. The Effects of Curcumin on Wound Healing in a Rat Model of Nasal Mucosal Trauma. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, [s.l.], v. 2017, p.1-6, 2017.

EUGSTER, 2014. Disponível em <
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curcuma_longa_roots.jpg> Acesso 07/07/2021

FABRE, Hebert SC et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of low-level laser therapy on the postoperative healing process. *Journal of physical therapy science*, v. 27, n. 6, p. 1645-1648, 2015.

FERREIRA, LUZIA SOUSA. Efeito terapêutico do uso combinado de biomenbrana de látex natural com curcumina e LEDterapia (Dispositivo Rapha®) em portadores de pé diabético, 2021

FERREIRA, M. et al. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*, v. 39, n. 3, p. 564–569, set. 2009.

FERREIRA, Maria José; BARROSO, Pedro; DUARTE, Nádia. Doença arterial periférica. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, v. 26, n. 5, p. 502-9, 2010.

FRADE, Marco Andrey Cipriani. Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira. 2003. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto., Universidade de São Paulo., Ribeirão Preto, 2003

FREITAS, Priscilla Ramos et al. Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias: uma revisão. 2019.

GALVANI, Emerson; LUCHIARI, Ailton. Critérios para classificação de anos com regime pluviométrico normal, seco e úmido. Climatologia aplicada: resgate aos estudos de caso. 1ed. Curitiba: CRV, 2012.

GODOY-SANTOS, Alexandre L. et al. Diabetic limb salvage procedure with bone allograft and free flap transfer: a case report. Diabetic foot & ankle, v. 8, n. 1, p. 1270076, 2017.

GONÇALVES, Fernanda Tarouco et al. Conceitos sobre pele e anexos a partir da temática cosméticos. 2017.

GOVEIA, Vania Regina; PINHEIRO, Silma Maria Cunha; GRAZIANO, Kazuko Uchikawa. Métodos de esterilização por baixa-temperatura e novas tecnologias. Revista Latino-Americana de Enfermagem, v. 15, n. 3, 2007.

GUERRA, André Fioravante. Microbiologia Geral. Biossegurança em Laboratórios de Microbiologia de Alimentos. Valença, 1ª Edição, 2017.

GUERRA, André Fioravante. Métodos de contagem microbiana. **Valença, 1ª Edição, 28p**, 2016.

GUYON, Alice. CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. Frontiers in cellular neuroscience, v. 8, p. 65, 2014.

HEISKANEN, Vladimir; HAMBLIN, Michael R. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes?. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 17, n. 8, p. 1003-1017, 2018.

HOEKMAN, John D.; SRIVASTAVA, Pramod; HO, Rodney JY. Aerosol-stable peptide-coated liposome nanoparticles: A proof-of-concept study with opioid fentanyl in enhancing analgesic effects and reducing plasma drug exposure. Journal of pharmaceutical sciences, v. 103, n. 8, p. 2231-2239, 2014.

HOURELD, Nicolette N. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. The Scientific World Journal, v. 2014, 2014.

Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas, National Institutes of Health, 2020 Disponível em < <https://sml.nhl.no/Klebsiella> > Acesso 11/01/2021

KANT, Vinay et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. International immunopharmacology, v. 20, n. 2, p. 322-330, 2014.

KANT, Vinay et al. Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats. Journal of Surgical Research, v. 193, n. 2, p. 978-988, 2015.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic escherichia coli. Nature reviews microbiology, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KAUSHAL, Jyoti et al. Catalase enzyme: application in bioremediation and food industry. Biocatalysis and agricultural biotechnology, v. 16, p. 192-199, 2018.

KOSECKA-STROJEK, Maja et al. Identification of Clinically Relevant Streptococcus and Enterococcus Species Based on Biochemical Methods and 16S rRNA, sodA, tuf, rpoB, and recA Gene Sequencing. *Pathogens*, v. 9, n. 11, p. 939, 2020.

KREISLERIANA, 2020. Disponível em
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proteus_mir_stain.jpg> Acesso 11/01/2021

KUFFLER, Damien P. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative medicine*, v. 11, n. 1, p. 107-122, 2016.

KUNG, Hsien-Feng et al. Inactivation of *Morganella morganii* by high hydrostatic pressure combined with lemon essential oil. *Food Science & Nutrition*, v. 8, n. 7, p. 3435-3441, 2020.

LABOCLIN. Bula meio Rugai com lisina. Disponível em:
<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/meio_de_rugai_com_lisina_510102_2.pdf> . Acesso em: 24/06/2021

LAUREANO, André; RODRIGUES, Ana Maria. Cicatrização de feridas. *Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia*, v. 69, n. 3, p. 355, 2011.

LEITE, Fernando Emanuel Ochoa Palorca Costa. Pé Diabético. 2011.

LEUNG, Ka Yin et al. *Edwardsiella tarda*–virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. *Microbes and infection*, v. 14, n. 1, p. 26-34, 2012.

LIMA, Lídia Moreira; FRAGA, Carlos Alberto Manssour; BARREIRO, Eliezer J. Agentes antiasmáticos modernos: antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 825-834, 2002.

LM Farma indústria e cosmético LTDA. Bula do medicamento Curatec® AGE (Ácidos graxos essenciais). Disponível em: <https://maxmedical.com.br/wp-content/uploads/2015/10/AGE-Essencial-Bula-Instru%C3%A7%C3%B5es-de-Uso.pdf>
Acesso em:18/02/2021

LM Farma indústria e cosmético LTDA. Bula do medicamento Curatec® alginato de cálcio e sódio. Disponível em:
<https://magazinemedica.com.br/media/images/ProductFile/6df18e1a859e20540d96db1e32512443.pdf> Acesso em:18/02/2021

LM Farma indústria e cosmético LTDA. Bula do medicamento Curatec® hidrocoloide plus. Disponível em: <<https://maxmedical.com.br/wp-content/uploads/2015/10/Hidrocol%C3%B3ide-Plus-Bula-Instru%C3%A7%C3%B5es-de-Uso.pdf>> Acesso em:18/02/2021

LÓPEZ-DELIS, Alberto et al. Characterization of the Cicatrization Process in Diabetic Foot Ulcers Based on the Production of Reactive Oxygen Species. *Journal Of Diabetes Research*, [s.l.], v. 2018, p.1-10, 2018.

LYCZAK, Jeffrey B.; CANNON, Carolyn L.; PIER, Gerald B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection*, v. 2, n. 9, p. 1051-1060, 2000.

MAGRINI, María Laura. Análisis del cumplimiento de las normativas vigentes y evaluación del método de esterilización por Formaldehído en la Central de Esterilización de un hospital público de la Provincia de Córdoba, 2019

MARCHI, Juliana Pelissari et al. Curcuma longa L., o açafão da terra, e seus benefícios medicinais. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, v. 20, n. 3, 2016

MASSEY, Ruth C. et al. The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission?. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 12, p. 953-958, 2006.

MENDES, Reila Tainá et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 52, n. 5, p. 774-782, 2012.

MERRELL, Jonathan G. et al. Curcumin loaded poly (ϵ -caprolactone) nanofibers: diabetic wound dressing with antioxidant and anti-inflammatory properties. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, v. 36, n. 12, p. 1149, 2009.

MICHAELIS moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/busca?r=0&f=0&t=0&palavra=exsudato>> Acesso em: 21 de fev. 2021.

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/oclus%C3%A3o/>>

> Acesso em: 21 de fev. 2021.

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/exsuda%C3%A7%C3%A3o/>> Acesso em: 21 de fev. 2021.

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/abscesso/>> Acesso em: 21 de fev. 2021.

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/emp%C3%ADrico/>> Acesso em: 21 de fev. 2021.

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/homeot%C3%A9rmico/>> Acesso em: 21 de fev. 2021

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/saprof%C3%ADtic/>> Acesso em: 21 de fev. 2021

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/emoliente/>> Acesso em: 21 de fev. 2021

_____ moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Melhoramentos. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/busca?r=0&f=0&t=0&palavra=exsudato>> Acesso em: 21 de fev. 2021.

MOREIRA, Mauro Ceretta et al. Utilização de conversores eletrônicos que alimentam LEDs de alto brilho na aplicação em tecido humano e sua interação terapêutica. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

NASCIMENTO, José Soares do. **Biologia de Microrganismos**. 2010. Disponível em: http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo_site/Biblioteca/Livro_4/6-Biologia_de_Microrganismos.pdf. Acesso em: 07 jul. 2021.

NETO, Fernando Antônio Ramos Schramm; MACHADO, Yuri de Jesus; VASCONCELOS, Juliana Fraga. A INFLUÊNCIA DO PARTO NA IMUNIDADE DO NEONATO. Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, v. 18, 2020.

NEVES, José et al. O pé diabético com infecção aguda: tratamento no Serviço de Urgência em Portugal. Revista Portuguesa de Cirurgia, n. 27, p. 19-36, 2013.

NUNES, Gustavo Adolfo Marcelino de Almeida et al. A system for treatment of diabetic foot ulcers using led irradiation and natural latex. **Research on Biomedical Engineering**, v. 32, p. 3-13, 2016. Rosa, S. S. R. F., Rosa, M. F. F., Fonseca, M. A. M., Luz, G. V. D. S.,

NGUYEN, Trung T.; MOBASHERY, Shahrar; CHANG, Mayland. Roles of matrix metalloproteinases in cutaneous wound healing. InTech, 2016.

NOOR, Saba; ZUBAIR, Mohammad; AHMAD, Jamal. Diabetic foot ulcer—a review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 9, n. 3, p. 192-199, 2015.

OTTO, Michael. Staphylococcus epidermidis—the 'accidental' pathogen. *Nature reviews microbiology*, v. 7, n. 8, p. 555-567, 2009.

PACHECO, Dinalia Carolina Lopes et al. Análise de contaminação bacteriana associada à sondagem vesical de demora em um hospital público da região do Tapajós. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 3, p. 5777-5794, 2020.

PATIÑO, Luz Angélica; MORALES, Camilo Andrés. Microbiota de la piel: el ecosistema cutáneo. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, v. 21, n. 2, p. 147-158, 2013.

PEREIRA, Rose Elisabeth Peres; PETRECHEN, Guilherme Grande. Principais métodos diagnósticos bacterianos—Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 16, p. 1-12, 2011.

PINHO, Erika Christina Canarim M. de et al. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, [s.l.], v. 67, n. 1, p.27-32, fev. 2004.

PODSCHUN, Rainer; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

QUEGE, Geovana Eloisa et al. Comparação da atividade de ácidos graxos essenciais e biomembrana na microbiota de feridas crônicas infectadas. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 10, n. 4, 2008.

- REINER, Karen. Catalase test protocol. American society for microbiology, p. 1-6, 2010..
- REIS, Maria do Carmo dos. Sistema indutor de neoformação tecidual para pé diabético com circuito emissor de luz de LEDs e utilização do látex natural. 2013. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Elétrica, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- ROSA, S. S. R. F. et al. Regeneration of diabetic foot ulcers based on therapy with red LED light and a natural latex biomembrane. *Annals of biomedical engineering*, v. 47, n. 4, p. 1153-1164, 2019.
- ROSA, Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury et al. A tecnologia rapha e sua incorporação no sistema único de saúde-sus: inovação de baixo custo dentro dos serviços de saúde. *Hegemonia: Revista de Ciências Sociais*, n. 24, p. 27-27, 2018.
- S. CHOI, S. Chang, R. Biswas, P. Chung, S. Mo, M.Y. Lee, J.C. Ahn, Light-emitting diode irradiation using 660 nm promotes human fibroblast HSP90 expression and changes cellular activity and morphology, *J. Biophotonics*. 12 (2019).
- SANTANA, THAMIS FERNANDES. Análise da Inflamação e Estresse Oxidativo no Processo de Cicatrização Tecidual Após o Uso Combinado de Lipossomas com Curcumina em Biomembranas de Látex Natural e LEDterapia para Regeneração Tecidual em Portadores de Úlcera Diabética, 2021.
- SIDHU, Gurmel S. et al. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. *Wound repair and regeneration*, v. 7, n. 5, p. 362-374, 1999.
- SILVA, Franciéle. Desenvolvimento e aplicação de terapia baseada no uso de biomembranas a base de látex (*hevea brasiliensis*) contendo lipossoma com curcumina (*curcuma longa*) e papaína (carica papaya) e LEDterapia no tratamento de feridas em ratos wistar (*rattus norvegicus*) diabéticos, 2020.
- SIMMONS, Hannah. **Micro-organismos fastidiosos crescentes no laboratório**. 2019. Disponível em: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Growing-Fastidious-Microorganisms-in-the-Laboratory-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Growing-Fastidious-Microorganisms-in-the-Laboratory-(Portuguese).aspx). Acesso em: 07 jul. 2021.
- SILVESTRE Labs Química e Farmacêutica Ltda. Bula do medicamento Dermazine®. Disponível em: <https://www.bulas.med.br/p/bulas-de-medicamentos/bula/7523/dermazine.htm> Acesso em: 18/02/2021
- SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, v. 44, n. 2, p. 129-146, 2001.
- TAKEO, Makoto; LEE, Wendy; ITO, Mayumi. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 5, n. 1, p. a023267, 2015.
- TATMATSU-ROCHA, José Carlos et al. Mitochondrial dynamics (fission and fusion) and collagen production in a rat model of diabetic wound healing treated by photobiomodulation: comparison of 904 nm laser and 850 nm light-emitting diode (LED). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 187, p. 41-47, 2018.
- THIERS, Sophie; TASSEAU, Olivier. Les cosméceutiques: cosmétiques ou médicaments. *MiDiFABs*, v. 3, p. 47-56, 2005.

TSOURDI, Elena et al. Current Aspects in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Wounds in Diabetes Mellitus. *Biomed Research International*, [s.l.], v. 2013, p.1-6, 2013.

VIEIRA, Carolina Sales; OLIVEIRA, Luciana Correa Oliveira de; SÁ, Marcos Felipe Silva de. Hormônios femininos e hemostasia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 10, p. 538-547, 2007.

VITORIANO, Natália Aguiar Moraes et al. Comparative study on laser and LED influence on tissue repair and improvement of neuropathic symptoms during the treatment of diabetic ulcers. *Lasers in medical science*, v. 34, n. 7, p. 1365-1371, 2019.

WANG, Qi et al. Blockade of receptor for advanced glycation end products improved essential response of inflammation in diabetic wound healing. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, v. 40, n. 2, p. 283-289, 2020.

WARNER, Rebecca M. *Applied statistics: From bivariate through multivariate techniques*. Sage Publications, 2012.

WOJCIK, Marzena et al. Associations of high blood sugar with oxidative stress and inflammation in patients with type 2 diabetes. In: *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*. Academic Press, 2020. p. 305-323.

YANG, Ping et al. Advanced glycation end products: potential mechanism and therapeutic target in cardiovascular complications under diabetes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2019, 2019.

YAZDANPANA, Leila. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World Journal Of Diabetes*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.37-53, fev. 2015.

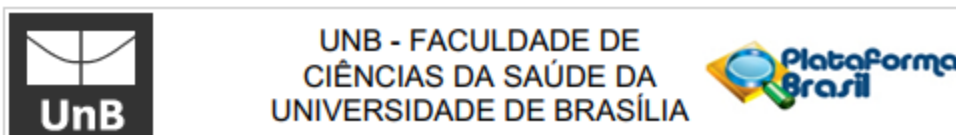
ZIMMERMANN, Marina et al. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. *Ciência Rural*, [s.l.], v. 37, n. 6, p.1719-1723, dez. 2007.

ANEXO 1 - CLASSIFICAÇÃO DE FERIDAS DA UNIVERSIDADE DO TEXAS

Escala	Grau			
	0	1	2	3
A (Ausência de infecção ou isquemia)	Lesão pré ou pós-ulcerativa completamente epitelizada	Ferida superficial não envolvendo tendão, cápsula ou osso	Ferida com exposição de tendão ou cápsula	Ferida com exposição de osso ou articulação
B	Infecção	Infecção	Infecção	Infecção
C	Isquemia	Isquemia	Isquemia	Isquemia
D	Isquemia e infecção	Isquemia e infecção	Isquemia e infecção	Isquemia e infecção

Fonte: FERREIRA, 2021.

ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ensaio clínico randomizado comparativo duplo cego aplicado em úlceras diabéticas de membros inferiores utilizando associação de biomembrana derivada do látex natural (Hevea Brasiliensis) e equipamento emissor de luz de leds de comprimento de onda variado ($450 \pm 20\text{nm}$ à $636 \pm 20\text{nm}$)

Pesquisador: Suelia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;
Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 2

CAAE: 94910718.5.0000.0030

Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Faculdade do

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Ministério da Saúde
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.962.901

Apresentação do Projeto:

Patrocinador principal: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Ministério da Saúde.

Local de realização da pesquisa: Hospital Regional da Asa Norte/SES/DF e Hospital Regional do Gama/SES/DF.

Resumo:

"Este é um projeto de pesquisa na área de biotecnologia - vinculado a Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora – DT, nível 2, a Bolsa Produtividade em Pesquisa 1C e ao Projeto de Pesquisa financiado Ministério da Saúde Termo de Cooperação TED 128/2016 e TED 129/2016. Trata-se Ensaio clínico randomizado comparativo duplo cego aplicado em úlceras diabéticas de membros inferiores utilizando associação de biomembrana derivada do látex natural (Hevea Brasiliensis) e equipamento emissor de luz de leds de comprimento de onda variado ($= 450 \pm 20\text{nm}$ à $= 636 \pm 20\text{nm}$). O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação conjunta do biomaterial látex (denominada biomembrana derivada do látex natural) e do equipamento emissor de luz de com um intervalo de comprimento de onda de $= 450 \pm 20\text{nm}$, 5mW a $= 636 \pm 20\text{nm}$,

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

ANEXO 3 – LAUDO DE ESTERILIZAÇÃO DA BLN

STERIMED CENTRAL	LAUDO DE ESTERILIZAÇÃO	Data: 29/06/2021 Hora: 09:37:21 Pgm: RRat_R010_Novo Usu: JRIDO Pág: 1
------------------	-------------------------------	---

Ciente: **1990 CENTRO DE APOIO AO DESEN TECNOLO CDT/UNB** CNPJ: **00038174001387**

AClave Lote R_M Data

P 3747 224737 22/09/2018

0 / /

0 / /

1.) CONTROLES DE ESTERILIZAÇÃO REALIZADOS:

Etapas	Testes	Especificação	Resultado
SELEÇÃO / TRIAGEM	TRIAGEM E CLASSIFICAÇÃO DOS ARTIGOS	Teste visual para a classificação e seleção dos artigos quanto ao aspecto, integridade e visibilidade do processamento.	De Acordo
LIMPEZA	LAVAGEM DOS ARTIGOS	Remoção de sujidade visíveis e detritos dos artigos, realizada com água adicionada de sabão ou detergente, de forma manual ou automatizada, por ação mecânica.	De Acordo (quando aplicável)
EMBALOTAMENTO	ACONDIIONAMENTO	Acondicionamento dos artigos em envoltório, recipiente ou qualquer forma de acondicionamento destinado a cobrir, empacotar, envasar, proteger ou manter o artigo que será processado.	De Acordo
ESTERILIZAÇÃO	CONTROLE DE CARGA	Teste Biológico	De Acordo
	CONTROLE DE INCUTE	Integrador Químico	De Acordo
	CONTROLE DE EQUIPAMENTO	Reprodução dos parâmetros de esterilização definidos na validação do processo	De Acordo
CONTROLE DE QUALIDADE	INSPEÇÃO VISUAL DO PRODUTO ESTERILIZADO	Avaliação de conformidade do produto acabado	De Acordo

3.) RESULTADOS:

- 3.1.) Teste biológico:** Não apresentou evidência de crescimento microbiano durante o período de incubação determinado.
- 3.2.) Integrador químico:** Houve mudança homogênea da cor evidenciando resultado satisfatório.
- 3.3.) Controle de equipamento:** Relatório impresso do ciclo/lote evidenciando regularidade no ciclo.

CONCLUSÃO: Resultados Satisfatórios

Responsável Técnico

 NILZA F. ANDRETA COSTA
 COREN 44132/SP

APÊNDICE A - TABELA DE RESULTADOS DA ANÁLISE ANOVA. SIGNIFICÂNCIA ATRIBUÍDA A P-VALOR <0,05. O RESULTADO DE SIGNIFICÂNCIA APRESENTADO FOI DE P-VALOR 0,9119. DEMONSTRANDO, PORTANTO, QUE NÃO HÁ DIFERENÇA SIGNIFICATIVA.

Table Analyzed

<i>Two-way ANOVA</i>	Ordinary				
<i>Alpha</i>	0,05				
<i>Source of Variation</i>	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
<i>Interaction</i>	9,651	0,9119	ns	No	
<i>Row Factor</i>	0,9355	0,8059	ns	No	
<i>Column Factor</i>	11,83	0,3783	ns	No	
<i>ANOVA table</i>	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
<i>Interaction</i>	4,088e+007	10	4,088e+006	F (10, 36) = 0,4478	P = 0,9119
<i>Row Factor</i>	3,962e+006	2	1,981e+006	F (2, 36) = 0,2171	P = 0,8059
<i>Column Factor</i>	5,012e+007	5	1,002e+007	F (5, 36) = 1,098	P = 0,3783
<i>Residual</i>	3,286e+008	36	9,127e+006		
<i>Number of missing values</i>	18				

APÊNDICE B - TABELA DE SUMARIZAÇÃO DE TESTE DE HIPÓTESE, NÃO-PARAMÉTRICO, DE AMOSTRAS RELACIONADAS DE TESTE DOS POSTOS SINALIZADOS DE WILCOXON.

Sumarização de Teste de Hipótese

	Hipótese nula	Teste	Sig. ^{a,b}	Decisão
D0	A mediana de diferenças entre Coleta Inicial (CI) D0 e Coleta Final(CF) D0 é igual a 0.	Amostras Relacionadas de Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon	,156	Retar a hipótese nula.

a. O nível de significância é ,050.

b. A significância assintótica é exibida.

	Hipótese nula	Teste	Sig. ^{a,b}	Decisão
D22	A mediana de diferenças entre Coleta Inicial (CI) D22 e Coleta Final(CF) D22 é igual a 0.	Amostras Relacionadas de Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon	,053	Retar a hipótese nula.

a. O nível de significância é ,050.

b. A significância assintótica é exibida.

	Hipótese nula	Teste	Sig. ^{a,b}	Decisão
D45	A mediana de diferenças entre Coleta Inicial (CI) D45 e Coleta Final(CF) D45 é igual a 0.	Amostras Relacionadas de Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon	,125	Retar a hipótese nula.

a. O nível de significância é ,050.

b. A significância assintótica é exibida.

APÊNDICE C - TABELA DE VARIAÇÃO BACTERIANA ENTRE A COLETA INICIAL (CI) E A COLETA FINAL (CF). OS NÚMEROS REPRESENTADOS NAS COLUNAS QUANDO SE APRESENTAM NEGATIVOS DEMONSTRAM DIMINUIÇÃO DA MICROBIOTA APÓS OS DEVIDOS PROTOCOLOS E SERÃO APRESENTADOS EM FONTE VERMELHA. OS NÚMEROS POSITIVOS EVIDENCIAM UM AUMENTO NA MICROBIOTA DA UPD E OS NÚMEROS PERMANECEM EM FONTE PRETO AUTOMÁTICO.

GRUPO	PARTICIPANTE	DIA	ESPÉCIE MICROBIANA				
			GRAM +		GRAM -		
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Edwardsiella</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp	<i>P. mirabilis</i>
GE 1	P1	D0	-61%	-28%	----	----	----
		D22	-5%	-2%	----	----	----
		D45	13%	27%	----	----	----
	P2	D0	-7%	-16%	----	----	----
		D22	111%	225%	----	----	----
		D45	-12%	-23%	----	----	----
	P3	D0	-2%	----	----	----	-5%
		D22	-4%	----	----	----	-20%
		D45	-3%	----	----	----	-6%
	P4	D0	-18%	----	----	----	----
		D22	-9%	----	----	----	----
		D45	-30%	----	----	----	----
	P5	D0	29%	87%	----	----	----
		D22	----	-76%	----	----	----
		D45	-70%	----	----	----	----
GE 2	P6	D0	-5%	----	----	----	----
		D22	16%	73%	----	----	----
		D45	----	-57%	----	----	----
	P8	D0	23%	----	----	----	----
		D22	7%	18%	----	----	----
		D45	-26%	----	----	----	----
	P9	D0	----	-82%	----	----	----
		D22	----	2%	----	----	----
		D45	----	137%	----	----	----
	P14	D0	----	----	-29%	----	----
		D22	----	----	66%	----	----
		D45	----	----	-30%	----	----
	P15	D0	----	----	-43%	----	----
		D22	----	----	88%	----	----
		D45	----	----	-23%	----	----
GC	P10	D0	----	50%	----	----	----
		D22	----	-58%	----	----	----
		D45	----	-53%	----	----	----
	P11	D0	----	-6%	----	----	----
		D22	----	-9%	----	----	----
		D45	----	-12%	----	----	----
	P12	D0	----	2%	----	5%	----
		D22	----	8%	----	18%	----
		D45	----	-33%	----	-57%	----
	P13	D0	121%	----	----	----	----
		D22	188%	----	----	----	----
		D45	-22%	----	----	----	----
	P7	D0	-15%	----	----	----	----
		D22	-26%	----	----	----	----
		D45	-18%	----	----	----	----