



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Carina Oliveira Dias

Estudo de biofilmes polimicrobianos bactéria-  
*Candida* de úlceras de pressão

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho realizado sob a orientação de:

**Doutora Fernanda Isabel Antunes Gomes**

## Direitos de Autor e Condições de Utilização do Trabalho por Terceiros

---

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

### *Licença concedida aos utilizadores deste trabalho*



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações  
CC BY-NC-NC

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## Agradecimentos

---

A conclusão desta dissertação de mestrado dita o fim de uma jornada não só na minha vida académica, como a nível pessoal onde tive o prazer de conviver com pessoas que me possibilitaram múltiplas aquisições de conhecimentos e valores, às quais devo o meu maior respeito e agradecimento.

Desta forma, quero agradecer o contributo e expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que me apoiaram em cada etapa, ponto e linha, rasura e esboço deste trabalho. Um obrigado especial à professora Fernanda Gomes, a minha orientadora, pela transmissão de conhecimento, simpatia, orientação, disponibilidade e também pela diversão com que sempre demonstrou encarar cada fase.

Gostaria ainda de agradecer a todo o grupo de investigação do LMaS, por fazerem deste uma boa casa e por me integrarem nesta família desde o primeiro dia. Em particular à professora Mariana Henriques, pela organização e prontidão com que me encaminhou, oferecendo calma e um reconfortante incentivo em cada reunião. Foi um enorme prazer trabalhar neste grupo.

Como não poderia deixar de ser, agradeço também a toda a minha família pelo apoio, por toda a confiança depositada em mim não só ao longo destes cinco anos como ao longo de toda a vida. Obrigada por serem MEUS e estarem presentes incondicionalmente.

Pretendo ainda, deixar um agradecimento especial ao meu namorado pela paciência, ajuda constante, carinho, disponibilidade, por ser incansável e nunca me deixar desistir. Sem ele, esta conquista não seria possível.

Por fim, gostava de deixar um agradecimento a todos os meus amigos por me ouvirem, incentivarem e mostrarem que nunca estamos sós.

## Declaração de Integridade

---

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo – Estudo de Biofilmes Polimicrobianos Bactéria–*Candida* de Úlceras de Pressão

As úlceras de pressão são um grande problema nos cuidados de saúde a nível mundial. Estas são definidas como lesões localizadas na pele, resultantes de pressões não aliviadas, com elevado risco de colonização e formação de biofilmes. O presente trabalho tem como objetivos amplificar o campo do conhecimento dos biofilmes polimicrobianos envolvendo bactérias e *Candida* spp e analisar as interações das espécies envolvidas em diferentes consórcios (biofilmes duplos e triplos), com e sem preformação de biofilmes bacterianos de 24 h, e estudar como essas interações afetam alguns fatores de virulência: capacidade de formação de biofilmes e de filamentação (*Candida* spp).

Procedeu-se ao estudo de biofilmes simples (BSs) e polimicrobianos duplos (BDs) e triplos (BTs). No caso de BDs e BTs os ensaios foram realizados com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* e de *S. aureus*+*P. aeruginosa*, respetivamente, tendo sido estudados os consórcios destes biofilmes com *C. parapsilosis* ou *C. albicans*. Os resultados demonstraram que em BDs a preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* inibiu a capacidade de formação de biofilmes de ambas as espécies de *Candida* estudadas. Quanto à capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus* na presença de *Candida* verificou-se que foi variável e dependente da espécie de *Candida* envolvida no consórcio. Quanto aos BTs, a capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus* foi menor na presença de ambas as espécies de *Candida* e o mesmo se verificou para a *C. parapsilosis* na presença dos BDs bacterianos em estudo, sendo esse efeito mais acentuado na presença de preformação de biofilme de 24 h de *S. aureus*. Quanto à capacidade de filamentação de ambas as espécies de *Candida*, de uma forma geral não foi verificada qualquer influência significativa, à exceção do consórcio *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, tendo-se observado que na presença destas bactérias, a capacidade de filamentação de *C. albicans* aumentou.

Em conclusão foi possível observar que em biofilmes polimicrobianos as interações entre bactérias e *Candida* são variáveis dependendo do consórcio em estudo. Porém, de uma forma geral foi possível observar que a presença de *S. aureus* inibiu a capacidade de formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e de ambas as *Candida* em estudo. No entanto, o mesmo não foi possível observar na capacidade de filamentação de *Candida*, uma vez que em geral, esta não variou significativamente.

**Palavras-chave:** Bactéria; Biofilmes; *Candida*; Fatores de Virulência; Úlceras de Pressão.

## Abstract – Study of Polymicrobial Bacteria–*Candida* Biofilms from Pressure Ulcers

---

Pressure ulcers are a major problem in healthcare worldwide and are defined as localized skin lesions resulting from unrelieved pressure, with a high risk of colonization and biofilm formation. This work aims to expand the field of knowledge of polymicrobial biofilms involving bacteria and *Candida* spp and to analyze the interactions of the species involved in different consortia (double and triple biofilms), with and without 24 h bacterial biofilm preformation, and to study how these interactions affect some virulence factors: biofilm formation capacity and filamentation (*Candida* spp).

Simple biofilms (SBs) and double (DBs) and triple (TBs) polymicrobial biofilms were studied. In the case of DBs and TBs, the tests were carried out with and without the preformation of 24 h biofilms of *S. aureus* and *S. aureus*+*P. aeruginosa*, respectively, and consortia of these biofilms with *C. parapsilosis* or *C. albicans* were studied. The results showed that in DBs the 24 h biofilm preformation of *S. aureus* inhibited the biofilm formation capacity of both *Candida* species studied. The biofilm-forming capacity of *S. aureus* in the presence of *Candida* was found to be variable and dependent on the *Candida* species involved in the consortium. As for TBs, the biofilm-forming capacity of *S. aureus* was lower in the presence of both *Candida* species and the same was true for *C. parapsilosis* in the presence of the bacterial DBs under study, this effect being more pronounced in the presence of 24 h biofilm preformation of *S. aureus*. Regarding the filamentation capacity of both *Candida* species, in general there was no significant influence, except for the *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* consortium, where it was observed that in the presence of these bacteria, the filamentation capacity of *C. albicans* increased.

In conclusion, it was possible to observe that in polymicrobial biofilms the interactions between bacteria and *Candida* vary depending on the consortium under study. However, in general, it was possible to observe that the presence of *S. aureus* inhibited the biofilm-forming capacity of *P. aeruginosa* and both *Candida* under study. However, the same could not be observed for the filamentation capacity of *Candida* since in general this did not vary significantly.

**Keywords:** Bacteria; Biofilms; *Candida*, Virulence Factors; Pressure Ulcers.

## Índice

---

Direitos de Autor e Condições de Utilização do Trabalho por Terceiros .....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de Integridade.....	iv
Resumo – Estudo de Biofilmes Polimicrobianos Bactéria– <i>Candida</i> de Úlceras de Pressão .....	v
Abstract – Study of Polymicrobial Bacteria– <i>Candida</i> Biofilms from Pressure Ulcers .....	vi
Índice.....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Glossário de Símbolos e Termos .....	xiv
<b>Capítulo 1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Descrição do Problema .....	1
1.2. Objetivos da Dissertação .....	1
1.3. Local de Desenvolvimento do Trabalho e Respetivas Tarefas .....	1
1.3.1. O Centro de Engenharia Biológica como Núcleo da Investigação .....	1
1.3.2. Tarefas Realizadas.....	2
1.4. Organização da Tese.....	2
<b>Capítulo 2. Estado da Arte.....</b>	<b>4</b>
2.1. Úlceras de Pressão (UPs).....	4
2.1.1. Caracterização e Etiologia .....	4
2.1.2. Classificação .....	6
2.1.3. Reparação Fisiológica de UPs .....	7
2.2. Colonização de UPs.....	8
2.2.1. Microrganismos Utilizados .....	9
2.2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
2.2.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
2.2.1.3. <i>Candida</i> .....	11
2.2.1.3.1. <i>Candida parapsilosis</i> .....	11
2.2.1.3.2. <i>Candida albicans</i> .....	12
2.3. Biofilmes .....	13
2.3.1. Formação de Biofilmes .....	14

2.4. Estratégias de Tratamento .....	15
2.4.1. Tratamentos Atuais para UPs.....	15
2.4.1.1. Reposicionar .....	15
2.4.1.2. Desbridamento.....	16
2.4.1.3. Terapia de Pressão Negativa (TPN).....	16
2.4.1.4. Curativos.....	16
2.4.1.5. Nutrição e Uso de Vitaminas.....	17
2.4.1.6. Agentes Antibacterianos .....	17
<b>Capítulo 3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>18</b>
3.1. Preparação de Meios de Cultura .....	18
3.1.1. Meios de Cultura Líquidos.....	18
3.1.2. Meios de Cultura Sólidos .....	18
3.2. Preparação de Soluções.....	19
3.3. Microrganismos e Condições de Crescimento.....	19
3.4. Preparação das Suspensões Celulares .....	20
3.4.1. Bactérias.....	20
3.4.2. Fungos .....	20
3.5. Formação de Biofilmes Simples .....	21
3.5.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme ao Longo do Tempo.....	21
3.6. Meios de Cultura Seletivos .....	22
3.6.1. Otimização do Meio TSA+ANB .....	22
3.7. Biofilmes Duplos.....	23
3.7.1. Biofilmes Duplos Bactéria- <i>Candida</i> .....	23
3.7.1.1. Formação de Biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>Candida</i> spp.....	23
3.7.1.1.1. Estudo de Fatores de Virulência de <i>Candida</i> spp .....	24
3.7.1.1.1.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme de <i>Candida</i> spp em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>Candida</i> spp.....	24
3.7.1.1.1.2. Estudo da Capacidade de Filamentação de <i>Candida</i> spp em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>Candida</i> spp.....	25
3.7.2. Biofilmes Duplos Bactéria-Bactéria.....	25
3.7.2.1. Formação de Biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	25
3.7.2.1.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme de <i>P. aeruginosa</i> em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	26
3.8. Biofilmes Triplos .....	26



3.8.1. Formação de Biofilmes de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp .....	26
3.8.1.1. Estudo de Fatores de Virulência de <i>Candida</i> spp .....	27
3.8.1.1.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme de <i>Candida</i> spp em Biofilmes Triplos de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp .....	27
3.8.1.1.2. Estudo da Capacidade de Filamentação de <i>Candida</i> spp em Biofilmes Triplos de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp .....	28
3.9. Análise estatística .....	28
<b>Capítulo 4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>29</b>
4.1. Biofilmes Simples .....	29
4.2. Otimização de Meios Seletivos .....	30
4.2.1. Otimização do Meio TSA+ANB .....	30
4.3. Capacidade de Formação de Biofilmes Duplos .....	32
4.3.1. Biofilmes Duplos Bactéria- <i>Candida</i> .....	32
4.3.1.1. Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	33
4.3.1.1.1. Capacidade de Formação de Biofilme de <i>C. parapsilosis</i> em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	33
4.3.1.1.2. Capacidade de Filamentação de <i>C. parapsilosis</i> em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	34
4.3.1.2. Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> .....	36
4.3.1.2.1. Capacidade de Formação de Biofilme de <i>C. albicans</i> em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> .....	36
4.3.1.2.2. Capacidade de Filamentação de <i>C. albicans</i> em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> .....	37
4.3.2. Biofilmes Duplos Bactéria-Bactéria.....	38
4.3.2.1. Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	38
4.3.2.1.1. Capacidade de Formação de Biofilme de <i>P. aeruginosa</i> em Biofilmes Duplos de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	38
4.4. Biofilmes Triplos .....	39
4.4.1. Biofilmes Triplos Bactéria- <i>Candida</i> .....	39
4.4.1.1. Biofilmes Triplos de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	39
4.4.1.1.1. Capacidade de Formação de Biofilme de <i>C. parapsilosis</i> em Biofilmes Triplos de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	39
4.4.1.1.2. Capacidade de Filamentação de <i>C. parapsilosis</i> em Biofilmes Triplos de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	41

- 4.4.1.2. Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*..... 41
  - 4.4.1.2.1. Capacidade de Formação de Biofilme de *C. albicans* em Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*..... 41
  - 4.4.1.2.2. Capacidade de Filamentação de *C. albicans* em Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*..... 43
  
- Capítulo 5. Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro ..... 44**
  - 5.1. Conclusões..... 44
  - 5.2. Propostas de Trabalho Futuro ..... 45
  
- Referências ..... 46**

## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Centro de Engenharia Biológica. ....	2
<b>Figura 2.</b> Tecido sob pressão. ....	5
<b>Figura 3.</b> Representação dos locais mais comuns de desenvolvimento de úlceras por pressão (UPs) dependendo do posicionamento do doente. ....	5
<b>Figura 4.</b> Cultura de <i>S. aureus</i> em <i>Trypic Soy Agar</i> (TSA). ....	9
<b>Figura 5.</b> Cultura de <i>P. aeruginosa</i> em <i>Trypic Soy Agar</i> (TSA). ....	10
<b>Figura 6.</b> Cultura de <i>C. parapsilosis</i> em <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA). ....	12
<b>Figura 7.</b> Cultura de <i>C. albicans</i> em <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA). ....	13
<b>Figura 8.</b> Etapas de desenvolvimento de um biofilme. ....	15
<b>Figura 9.</b> Câmara de Neubauer e representação da área usada na contagem de células de <i>Candida</i> spp. ....	20
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do trabalho elaborado para a quantificação de UFC/mL de biofilmes simples (BSs) ao longo do tempo. ....	22
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do trabalho elaborado para a otimização de meios seletivos. ....	22
<b>Figura 12.</b> Teste de microdiluição para determinação da CMI e CMF da <i>C. albicans</i> à anfotericina B (ANB) realizado em placa de 96 poços, por 24 h, a 37 °C. ....	23
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática do trabalho elaborado para a formação de biofilmes duplos (BDs) <i>S. aureus</i> e <i>Candida</i> spp. ....	25
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática do trabalho elaborado para a formação de biofilmes duplos (BDs) <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> . ....	26
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática do trabalho elaborado para a formação de biofilmes triplos (BTs) <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp. ....	28
<b>Figura 16.</b> Logaritmo de UFC/mL de biofilmes simples de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i> após 24 h, 48 h e 72 h de incubação. ....	29
<b>Figura 17.</b> Teste de suscetibilidade de <i>C. albicans</i> à anfotericina B (ANB). ....	31
<b>Figura 18.</b> Determinação da CMF da anfotericina B (ANB) em <i>C. albicans</i> . ....	31
<b>Figura 19.</b> Capacidade de formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>C. parapsilosis</i> (biofilmes simples e biofilmes duplos) com (BD_48;24) e sem preformação (BD_24;24) de biofilmes de 24 h de <i>S. aureus</i> . ....	33
<b>Figura 20.</b> Capacidade de formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> (biofilmes simples e biofilmes duplos) com (BD_48;24) e sem preformação (BD_24;24) de biofilmes de 24 h de <i>S. aureus</i> . ....	36
<b>Figura 21.</b> Capacidade de formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> (biofilmes simples e biofilmes duplos) com (BD_48;24) e sem preformação (BD_24;24) de biofilmes de 24 h de <i>S. aureus</i> . ....	38

**Figura 22.** Capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis* (biofilmes simples, duplos e triplos) com (BD\_48;48;24) e sem preformação (BD\_24;24;24) de biofilmes duplos de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. ..... 40

**Figura 23.** Capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (biofilmes simples, duplos e triplos) com (BD\_48;48;24) e sem preformação (BD\_24;24;24) de biofilmes duplos de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. ..... 42

## Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Fatores de risco intrínsecos e extrínsecos associados ao desenvolvimento de úlceras de pressão (UPs) .....	6
<b>Tabela 2.</b> Sistema de classificação do <i>National Pressure Injury Advisory Panel</i> (NPIAP). .....	7
<b>Tabela 3.</b> Crescimento dos vários microrganismos em estudo em diferentes meios de cultura.....	30
<b>Tabela 4.</b> Resultado do meio TSA+ANB otimizado na resposta ao crescimento dos vários microrganismos em estudo.....	32
<b>Tabela 5.</b> Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes duplos (BDs) de <i>C. parapsilosis</i> .....	35
<b>Tabela 6.</b> Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes duplos (BDs) de <i>C. albicans</i> .....	37
<b>Tabela 7.</b> Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes triplos (BTs) de <i>C. parapsilosis</i> .....	41
<b>Tabela 8.</b> Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes triplos (BTs) de <i>C. albicans</i> . .....	43

## Glossário de Símbolos e Termos

---

### Glossário de Termos (siglas e palavras inglesas e portuguesas)

#### **A**

*ANB* - Anfotericina B

#### **B**

*BDs* - Biofilmes Duplos

*BSs* - Biofilmes Simples

*BTs* - Biofilmes Triplos

#### **C**

*CEB* - Centro de Engenharia Biológica

*CLSI* - Clinical and Laboratory Standards Institute

*CMI* - Concentração Mínima Inibitória

*CMF* - Concentração Mínima Fungicida

#### **D**

*DO* - Densidade Ótica

#### **E**

*EUA* - Estados Unidos da América

#### **G**

*GEN* - Gentamicina

#### **I**

*I&D* - Investigação e Desenvolvimento

#### **L**

*LMaS* - Laboratório de Microbiologia Aplicada à Saúde

#### **M**

*MSA* - Mannitol Salt Agar

#### **N**

*NPs* - Nanopartículas

*NPIAP* - National Pressure Injury Advisory Panel

*NPUAP* - National Pressure Ulcer Advisory Panel

#### **O**

*OEs* - Óleos Essenciais

*OMS* - Organização Mundial da Saúde

#### **P**

*PBS* - Phosphate-Buffered Saline

*PIA* - Pseudomonas Isolation Agar

#### **R**

*rpm* - Rotações Por Minuto

*RPMI* 1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640

## **S**

*SDA* - Sabouraud Dextrose Agar

*SDB* - Sabouraud Dextrose Broth

*SPEs* - Substâncias Poliméricas Extracelulares

## **T**

*TPN* - Terapia de Pressão Negativa

*TSA* - Tryptic Soy Agar

*TSB* - Tryptic Soy Broth

## **U**

*UE* - União Europeia

*UFCs* - Unidades Formadoras De Colônias

*UPs* - Úlceras de Pressão

## **V**

*VCZ* - Voriconazol

# Capítulo 1. Introdução

---

## 1.1. Descrição do Problema

Atualmente, as úlceras de pressão (UPs), definidas como lesões localizadas na pele, são um problema significativo nos cuidados de saúde a nível mundial, afetando milhares de pessoas a cada ano, principalmente idosos, pessoas acamadas ou com mobilidade reduzida. A sua natureza crónica associa-se ao facto de fornecerem um ambiente propício para a colonização microbiana nomeadamente de natureza polimicrobiana e consequente formação de biofilmes. Assim, a presença de biofilmes polimicrobianos nas feridas contribui para implicações e persistência das UPs.

Dada esta problemática torna-se necessário alargar o conhecimento sobre os biofilmes polimicrobianos associados a UPs.

## 1.2. Objetivos da Dissertação

Os objetivos da presente dissertação focam-se no estudo de biofilmes simples (BSs) e polimicrobianos, incluindo biofilmes duplos (BDs) e triplos (BTs), envolvendo bactérias e fungos nomeadamente da espécie *Candida* potencialmente envolvidos na colonização de feridas crónicas, tais como as UPs. De forma mais precisa, visa-se analisar as interações bactérias-*Candida* com e sem preformação de biofilmes bacterianos e como estas interações afetam alguns fatores de virulência da *Candida*, tais como formação de biofilme e capacidade de filamentação.

## 1.3. Local de Desenvolvimento do Trabalho e Respetivas Tarefas

### 1.3.1. O Centro de Engenharia Biológica como Núcleo da Investigação

O Centro de Engenharia Biológica (CEB) (**Figura 1**), localizado no campus de Gualtar da Universidade do Minho, é um centro de investigação cuja pesquisa central é focada em quatro áreas que alocam as escalas molecular, celular e de processo. São elas a Biotecnologia Industrial e Bioengenharia, a Biotecnologia e Bioengenharia de Alimentos, a Biotecnologia Ambiental e Bioengenharia e a Biotecnologia e Bioengenharia da Saúde. Avaliado pelas unidades de I&D da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), tendo obtido a classificação de Excelente desde 2002.





**Figura 1.** Centro de Engenharia Biológica.

Para além dos distintos artigos e teses de doutoramento publicados, foram também conseguidas 15 publicações de patentes e lançadas mais de 14 empresas *spin-off* *start-ups*, graças ao reconhecido trabalho dos investigadores do CEB, em consolidação com projetos de investigação e desenvolvimento.

A nível internacional, o CEB estabeleceu um conjunto de parcerias, que levaram a projetos de pesquisa com diversas entidades reconhecidas mundialmente, intercâmbios de estudantes e cientistas, etc. O CEB acolhe investigadores de 45 diferentes nacionalidades, mostrando assim o seu reconhecimento internacional.

### 1.3.2. Tarefas Realizadas

O trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado dividiu-se em três grandes tarefas. Na primeira tarefa, realizou-se o estudo de BSs e posteriormente, uma pesquisa bibliográfica referente ao tema (T1). Na segunda tarefa, procedeu-se à otimização dos meios seletivos e após otimização, prosseguiu-se com o estudo dos biofilmes, biofilmes duplos (BDs) e triplos (BTs) (T2). Por fim e durante todo o espaço temporal do desenvolvimento da tese, realizou-se a escrita da mesma, bem como reuniões calendarizadas quinzenalmente pelo grupo LMaS e seminários “*Biofilm Group Seminars*” calendarizados trimensalmente pelo grupo BIOFILM (T3).

## 1.4. Organização da Tese

A presente dissertação de mestrado encontra-se dividida em cinco capítulos.

No presente capítulo, é realizado um pequeno enquadramento geral do que foi feito ao longo dos doze meses, bem como uma breve apresentação, descrevendo o problema e objetivos da mesma. É também apresentada a entidade onde se realizou a dissertação.

O capítulo dois inclui, detalhadamente, a informação teórica recolhida ao longo do tempo, de forma a enquadrar o tema da tese.

No capítulo três são introduzidos todos os materiais e métodos utilizados ao longo do trabalho experimental, sendo que, os resultados obtidos foram analisados e posteriormente discutidos no capítulo quatro.

No capítulo cinco são descritas as principais conclusões de toda a dissertação e apresentadas sugestões de trabalhos futuros para a parte laboratorial.

No final, encontram-se também as referências bibliográficas de suporte à escrita e discussão da tese.

## Capítulo 2. Estado da Arte

---

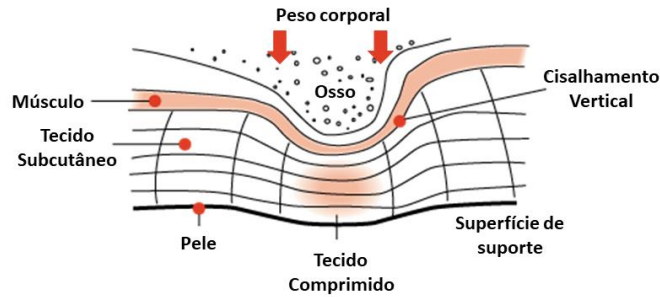
As lesões por pressão, também conhecidas como úlceras de pressão (UPs), são um grande problema nos cuidados de saúde a nível mundial, afetando mais de 2,5 milhões de pacientes nos Estados Unidos da América (EUA), entre os quais 60 mil acabam por morrer (Steven Peck, 2023). A magnitude deste problema é frequentemente medida pela *prevalência i.e.* esta é definida como o número de pessoas com UPs como uma proporção de toda a população de pacientes, medida num ponto específico no tempo ou durante um período específico (Day, 2009). Estudos sobre UPs, em diferentes países da Europa relatam prevalências com taxas de cerca de 7,87 % em Espanha (Pancorbo-Hidalgo *et al.*, 2014), entre 18,2 % a 54 % na Noruega (Bredesen *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2015) e 12 % na Irlanda (Moore *et al.*, 2015). Em Portugal, estudos apresentam prevalências de UPs de 4,9 % durante o internamento hospitalar (Por *et al.*, 2015) e 7,9 % na primeira avaliação da pele após a admissão (P. M. G. Sardo *et al.*, 2016).

O aparecimento de UPs em idosos, pessoas acamadas ou com mobilidade reduzida é particularmente recorrente devido à mobilidade restrita e aos diversos problemas de saúde. O seu surgimento diminui a qualidade de vida dos pacientes, devido à dor, aos tratamentos e ao aumento do tempo de permanência em unidades de saúde, em parte no seguimento do aparecimento de infeções (Edwards, 1994; Garibaldi *et al.*, 1981; Maklebust, 1997; Scheckler & Peterson, 1986). Deste modo, torna-se importante alargar o conhecimento sobre a natureza polimicrobiana das UPs, dado que estas contribuem para inúmeras implicações.

### 2.1. Úlceras de Pressão (UPs)

#### 2.1.1. Caracterização e Etiologia

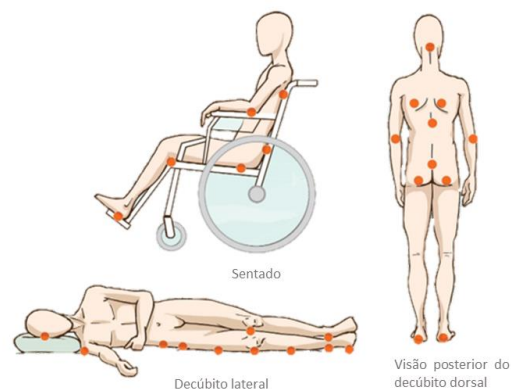
As UPs são definidas como qualquer lesão localizada na pele e/ou tecido subjacente, geralmente sobre uma proeminência óssea ou relacionada a dispositivos médicos, como resultado de pressão, forças de cisalhamento ou fricção não aliviada na pele, levando a lesões superficiais ou profundas (**Figura 2**) (Edsberg *et al.*, 2016; P. W. Smith *et al.*, 1999; Taradaj, 2017).



**Figura 2.** Tecido sob pressão. Adaptado de Wound Care, 2022.

Assim, quando sobre os tecidos debilitados, é realizada uma pressão suficiente para que os capilares que perfazem a pele sejam comprimidos e o fluxo sanguíneo seja bloqueado, podendo ocorrer isquemia, morte celular e em última instância necrose tecidual. Deste modo, a destruição e a rutura dos tecidos levam à destruição progressiva e necrose dos tecidos débeis subjacentes (Lyder & Ayello, 2008; Suddarth's & Brunner, 2010).

Estas, tal como mencionado anteriormente, geralmente ocorrem sobre proeminências ósseas. Assim, locais como sacro, ombros, occipital, lóbulos das orelhas, cotovelos e trocânteres são as localizações anatómicas geralmente mais acometidas (**Figura 3**) (Kottner *et al.*, 2009; National Pressure Ulcer Advisory Panel & European Pressure Ulcer Advisory Panel, 2009; Scheel-Sailer *et al.*, 2013; Vanderwee *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Representação dos locais mais comuns de desenvolvimento de úlceras por pressão (UPs) dependendo do posicionamento do doente. Adaptado de Úlceras Por Pressão Nos Idosos, 2021.

Existem mais de 100 fatores de risco associados ao desenvolvimento de UPs identificados na literatura (**Tabela 1**), tanto riscos fisiológicos (intrínsecos) quanto não fisiológicos (extrínsecos). De todos, a pressão exercida por um período excessivo é o que revela ser a maior causa de UPs. Adicionalmente, existem outros riscos extrínsecos que podem danificar a pele, incluindo fricção na superfície da pele, forças de cisalhamento - deslocamento lateral da pele, cujas camadas são de diferentes firmezas - e

humidade. A humidade não causa lesão por pressão, mas pode promover a formação de feridas crónicas por amaciar as camadas superiores da pele (maceração) e alterar o ambiente químico cutâneo (pH alterado). Além disso, a perda da percepção sensorial (nível de consciência prejudicado) e a imobilidade são fatores de risco cruciais para a formação de UPs, pois os pacientes não se apercebem do desconforto e não mudam de posição para aliviar a pressão (Anders *et al.*, 2010; Bates-Jensen *et al.*, 2009; Bhattacharya & Mishra, 2015; Coleman *et al.*, 2013; Peter Lowthian *et al.*, 2007; P. W. Smith *et al.*, 1999; Voegeli, 2011).


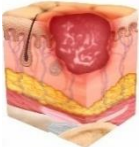

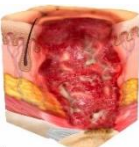

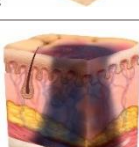
**Tabela 1.** Fatores de risco intrínsecos e extrínsecos associados ao desenvolvimento de úlceras de pressão (UPs). Dados de Voegeli, 2011

Fatores de risco	
Extrínsecos	Intrínsecos
Pressão	Mobilidade reduzida/Imobilidade
Atrito	Estado nutricional/Hidratação
Tensão de cisalhamento	Idade avançada
Humidade	Hipotensão
Medicação	Doença crónica/aguda/terminal
Movimentação/Manuseio hostil	Problemas hematológicos
Higiene pessoal	Falta de sensibilidade de dor ou pressão
	Baixa perfusão
	Estado geral de saúde

### 2.1.2. Classificação

As UPs continuam a ser um desafio para os profissionais de saúde (Dealey *et al.*, 2015; P. Sardo *et al.*, 2015) e representam um indicador da qualidade dos cuidados dos mesmos (Dealey *et al.*, 2012; Hopkins, 2012; Silva *et al.*, 2013). Assim, a prevenção efetiva destas é importante e depende da avaliação realizada pelos profissionais. Porém, ainda existe um desconhecimento sobre os estágios de UPs adquiridas em meio hospitalar. Desta forma, são usadas várias escalas de classificação (Black *et al.*, 1997; J.D. Shea, 1975; Yarkony *et al.*, 1989), mas o sistema *National Pressure Injury Advisory Panel* (NPIAP), anteriormente *National Pressure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP) é amplamente adotado. Este sistema define 6 estágios de UPs (Tabela 2) e classifica-os de acordo com a gravidade e o nível de lesão tecidual, desde o estágio 1 - eritema não branqueável da pele intacta - até ao estágio 4 - perda total da espessura da pele. Dois outros estágios ‘lesão não classificável’ e ‘lesão tecidual profunda’ são agora reconhecidos (Edsberg *et al.*, 2016). Para a avaliação de UPs a observação deve ocorrer após a limpeza do leito da ferida para garantir a visualização perfeita da anatomia da mesma. Caso esteja obstruída por esfacelo ou tecido necrótico, a UP é classificada como “não estagiável”.

**Tabela 2.** Sistema de classificação do *National Pressure Injury Advisory Panel* (NPIAP). Dados de Edsberg *et al.*, 2016

Estágio de UP	Descrição	Outras notas
1	 Eritema não branqueável da pele intacta.	Eritema não branqueável ou alterações sensoriais podem preceder o desenvolvimento da lesão do estágio 1; descoloração roxa ou castanha indicam lesão por pressão tecidual profunda.
2	 Perda da espessura parcial da pele com derme exposta.	Tecidos adiposos ou mais profundos não são expostos; muitas vezes causada por microclima adverso e cisalhamento.
3	 Perda total da espessura da pele.	O tecido adiposo é visível no leito da úlcera, que pode apresentar solapamento e tunelamento; fáscia, músculo, tendão, ligamento, cartilagem ou osso não são expostos.
4	 Perda total da espessura da pele.	Fáscia, músculo, tendão, ligamento, cartilagem ou osso são expostos; descolamento, tunelamento e e píbole podem estar presentes.
Lesão não classificável	 Perda de tecido e pele de espessura total obscurecida.	A extensão do dano tecidual dentro da úlcera é obscurecida por esfacelo ou escara e não pode ser determinada; remoção de esfacelo ou escara revela uma lesão por pressão de estágio 3 ou 4.
Lesão tecidual profunda	 Descoloração vermelho-escura, castanha ou roxa persistente e que não embranquece.	Pode ser visto com pele intacta ou não intacta.

É importante ainda ressaltar que, embora os diferentes estágios estejam classificados por numeração e provável evolução, a deterioração das UPs não segue uma progressão previsível e linear (Edsberg *et al.*, 2016).

### 2.1.3. Reparação Fisiológica de UPs

De todos os órgãos do corpo humano, a pele é, sem dúvida, a mais exposta a danos, lesões, arranhões e queimaduras. Ao danificar o epitélio e as estruturas conectivas, a capacidade de proteção que esta oferece contra o ambiente externo fica enfraquecido. Portanto, é imperativo a recriação de uma epiderme funcional. A recriação desta é realizada por um processo biológico normal conhecido por cicatrização de feridas (van Koppen & Hartmann, 2015). Quando o processo de cicatrização ocorre de forma inadequada podem ocorrer lesões graves, como a perda de pele, início de uma infecção com consequentes danos aos tecidos subjacentes ou até infecções sistêmicas (Sorg *et al.*, 2017). O

impedimento mais comum e inevitável à cicatrização de feridas é a instalação de uma infecção, principalmente no caso de feridas crônicas, como por exemplo UPs. Embora as bactérias e leveduras sejam uma parte comum da microbiota intacta da pele e das feridas, um limiar crítico de bactérias e leveduras existentes formam biofilmes mono ou polimicrobianos, incorporando as células numa matriz polimérica autoproduzida, protegendo-as de respostas imunitárias do hospedeiro e dos antibióticos, dificultando assim o processo de cicatrização das mesmas (Bowler *et al.*, 2001; Rahim *et al.*, 2017; Serra *et al.*, 2015).

## 2.2. Colonização de UPs

Existem quatro filos bacterianos predominantes na pele: Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes que colonizam e participam ativamente na inibição de infecções cutâneas (Grice *et al.*, 2014). Deste modo, a diversidade da microbiota da pele e o microambiente cutâneo podem influenciar o processo de cicatrização de feridas e a ocorrência de infecções cutâneas (van Rensburg *et al.*, 2015)

Assim, quando a pele é danificada, os microrganismos típicos da flora normal da pele, bactérias e fungos exógenos invadem os tecidos, dado que estes oferecem um ambiente húmido, quente, rico em nutrientes e com pH ótimo para o seu desenvolvimento (Gomes *et al.*, 2022; Sarheed *et al.*, 2016). Desta maneira, uma ferida aberta é um local favorável para a proliferação e colonização microbiana. Além disso, acredita-se que o desenvolvimento de biofilmes nas UPs desempenhe um papel importante no comprometimento da cicatrização de feridas, particularmente nas UPs crônicas que não cicatrizam (Conlon *et al.*, 2015; Cutting & Ed, 2006; Rotstein *et al.*, 1989), dado que, a formação de um biofilme é um fator de virulência exibido por diversas bactérias e fungos (James *et al.*, 2008).

Nas fases iniciais do desenvolvimento de uma ferida crônica, as bactérias gram-positivas, principalmente *Staphylococcus aureus*, são as mais frequentemente isoladas. Em fases mais avançadas, bactérias gram-negativas como, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são as regularmente identificadas e provavelmente penetram nas camadas mais profundas da pele, afetando significativamente os tecidos (Cardona & Wilson, 2015). Além destes, outros também foram isolados, nomeadamente *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* spp, *Bacteroides* spp e fungos, incluindo *Candida* spp (Cereda *et al.*, 2015; Taradaj, 2017; Wolcott *et al.*, 2016). Embora se tenha encontrado pouca referência sobre a relação dos diversos microrganismos em infecções relacionadas a UPs, foi demonstrado que os fungos desempenham um papel importante como patógenos oportunistas de feridas (Dowd *et al.*, 2011; Espejo *et al.*, 2018; Granel-Brocard, 2011). Posto isto, vários estudos Dowd *et al.*, 2011; Espejo *et al.*, 2018 e Livesley & Chow,

2002 descreveram as infecções em feridas crônicas como, frequentemente polimicrobianas e complexas, e a sua ascendência e mistura de espécies microbianas depende da duração, localização e estágio da UP.

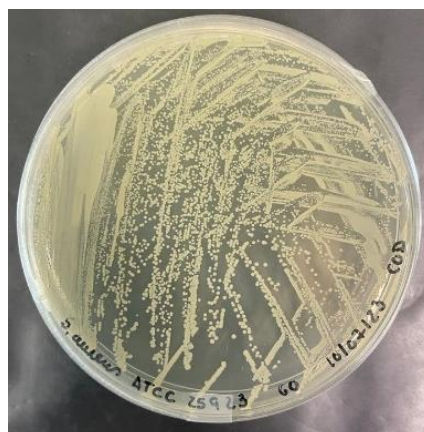
### 2.2.1. Microrganismos Utilizados

Na medida em que, a maioria dos estudos encontrados na literatura sobre colonização de UPs é mencionado que, principalmente bactérias como *S. aureus* e *P. aeruginosa* ou fungos do gênero *Candida* são estirpes recorrentemente identificadas, desta forma, para a realização do presente trabalho escolheu-se os seguintes microrganismos: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*.

#### 2.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende atualmente mais de 50 espécies. Estas bactérias pequenas e resistentes encontram-se no meio ambiente, na flora normal da pele e nas membranas das mucosas de muitas espécies de animais, incluindo a humana (Fetsch & Johler, 2018; Franklin D. Lowy, 1998).

Em 1880, o cirurgião escocês Sir Alexander Ogston, isolou pela primeira vez *Staphylococcus* do pus de um abscesso cirúrgico humano. Quando visualizadas ao microscópio estas eram semelhantes a um cacho de uvas, daí a sua denominação do grego *staphyle* que significa cacho de uvas e *kokkos* (baga) (Sejvar, 2013). Em 1884, Anton J. Rosenbach, um cirurgião alemão isolou duas espécies de *Staphylococcus* em cultura pura, em que intitulou devido à aparência pigmentada das colônias: *S. aureus*, do latim *aureum* que significa ouro (**Figura 4**) e *S. albus*, agora chamado *epidermidis*, do latim *albus* para branco (Rosenbach, 1884).



**Figura 4.** Cultura de *S. aureus* em *Tryptic Soy Agar* (TSA).

*S. aureus* é uma bactéria gram-positiva pertencente à família *Micrococcaceae*. Esta cresce em ambientes com temperaturas entre os 7 °C e os 46 °C, tem uma temperatura ótima de crescimento



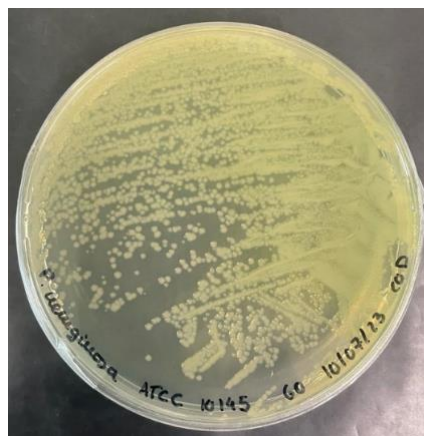
entre os 35 °C e os 37 °C. Quanto ao pH consegue crescer num intervalo de valores de 4,5 a 9,3, sendo que a taxa específica de crescimento é máxima quando os valores de pH se encontram entre 6,0 e 7,0. É uma bactéria reconhecida pela sua elevada osmotolerância pelo que, consegue crescer em ambientes com valores de atividade de água superiores a 0,86 e com uma concentração de cloreto de sódio (NaCl) entre 5 % e 7 %. Por último é uma bactéria anaeróbia facultativa, pelo que cresce quer na presença ou ausência de oxigénio (Escola Superior de Biotecnologia, 2023).

*S. aureus* é um importante patógeno humano bacteriano em infeções comunitárias e nosocomiais (Franklin D. Lowy, 1998). Desta forma, uma série de fatores de virulência permite-lhes aderir à superfície, invadir ou evitar o sistema imunitário e causar efeitos tóxicos prejudiciais ao hospedeiro. Assim, a sua capacidade de formar biofilmes é relatada como uma propriedade vital envolvida na patogenicidade da bactéria (Bien *et al.*, 2011; Kadkhoda *et al.*, 2020).

#### 2.2.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

O género *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonadaceae. Atualmente, este género contém um total de oito grupos, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. syringae* e *incertae sedis* (Nicholas M Moore & Maribeth L Flaws, 2011)

Em 1882, Carle Gessard, um químico e bacteriologista parisiense, isolou pela primeira vez *P. aeruginosa* de infeções de feridas de soldados cujas bandagens tinham uma cor azul-esverdeada (Figura 5).



**Figura 5.** Cultura de *P. aeruginosa* em *Tryptic Soy Agar* (TSA).

A *P. aeruginosa*, também conhecida por *Pseudomonas pyocyanea*, é uma bactéria gram-negativa heterotrófica, móvel em forma de bastonete. É um microrganismo não fermentativo e aeróbio facultativo, que na ausência de oxigénio usa o nitrato como aceitador final de eletrões (Diggle & Whiteley, 2020). Possui ainda uma elevada tolerância a vários fatores de stress, tanto físicos como químicos, como

por exemplo, é capaz de se multiplicar a temperaturas entre os 4 e os 50 °C (Barbier *et al.*, 2014) e possui elevados níveis de tolerância a compostos quaternários de amónio (Langsrud *et al.*, 2003).

Quanto à patogenicidade desta bactéria esta é capaz de alternar entre o estilo de vida planctónico e o crescimento em biofilme, o que a ajuda a sobreviver em nichos específicos, conferindo-lhe uma maior tolerância a desinfetantes e antibióticos (Kerr & Snelling, 2009).

### 2.2.1.3. *Candida*

Os fungos do género *Candida* é composto por um grupo extremamente heterogéneo de microrganismos que crescem sob a forma de leveduras. Porém, a maior parte dos microrganismos presentes neste grupo desenvolvem também um tipo de crescimento filamentoso (pseudo-hifas). Além das pseudo-hifas, *C. albicans* e *Candida dubliniensis* formam hifas verdadeiras (tubos germinativos) e células de paredes espessas denominadas por clamidósporos, ambas utilizadas pelos laboratórios de diagnóstico micológico na identificação destas espécies (Filler *et al.*, 2002).

#### 2.2.1.3.1. *Candida parapsilosis*

Desde a sua descoberta em 1928 por Adhford, *C. parapsilosis* passou por diversas classificações filogenéticas. Inicialmente, isolada de fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico, a espécie foi primeiramente classificada por *Monilia parapsilosis*, uma espécie do género *Monilia*, incapaz de fermentar a maltose, para distingui-la da *Monilia psilosis*, que hoje é conhecida como *C. albicans* (Trofa *et al.*, 2008; Weems, 1992). Em 1932, esta foi renomeada para *C. parapsilosis*.

As células de *C. parapsilosis* exibem formas ovais, redondas ou cilíndricas, quando cultivadas em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), as colónias são brancas, cremosas, brilhantes, lisas ou rugosas (**Figura 6**). Ao contrário de *C. albicans* e *C. tropicalis*, que podem existir em múltiplas formas morfogenéticas, *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras e existe apenas em fase de levedura ou em forma pseudo-hifal (Laffey & Butler, 2005).



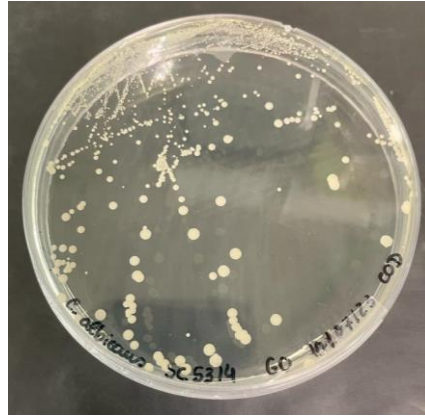
**Figura 6.** Cultura de *C. parapsilosis* em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

Na última década, relatórios têm vindo a demonstrar que *C. parapsilosis* é a segunda espécie do género *Candida* mais frequentemente isolada de hemoculturas (Brito *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2006; Costa-De-Oliveira *et al.*, 2008; Fridkin *et al.*, 2006; Krčmery *et al.*, 2000; Messer *et al.*, 2006; Pfaller *et al.*, 1998, 2001), superando mesmo a *C. albicans* em alguns hospitais europeus (Pfaller *et al.*, 2001), asiáticos (Nakamura & Takahashi, 2006; Ng *et al.*, 2000) e sul-americanos (MEDRANO *et al.*, 2006).

Tal como os outros microrganismos, as espécies de *Candida* também desenvolvem diversas estratégias para aumentar a sua patogenicidade. A virulência de *C. parapsilosis* é atribuída principalmente à sua capacidade intrínseca de aderir às superfícies abióticas de dispositivos médicos, materiais protéticos e ao epitélio da mucosa do hospedeiro. Esta capacidade é fundamental para a formação de biofilmes e consequentemente danos ao hospedeiro (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Németh *et al.*, 2013).

#### 2.2.1.3.2. *Candida albicans*

Em 1847 o micologista francês Charles Philippe Robin classificou este fungo como *Oidium albicans*, usando *albicans* que significa “branquear”. Mais tarde, em 1923, Berkhout reclassificou o fungo sob o atual género *Candida*, nome derivado da palavra latina *toga candida*, referindo-se à toga branca (manto) usada pelos senadores romanos da antiga república romana, uma provável referência às colónias esbranquiçadas em agar (**Figura 7**) ou lesões brancas (Barnett, 2004; Filler *et al.*, 2002; Lynch & Memphis, 1994).



**Figura 7.** Cultura de *C. albicans* em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

*C. albicans* é um fungo dimórfico (capacidade de realizar transição morfológica entre a forma de levedura e a forma filamentosa) gram-positivo, que cresce comensalmente no trato gastrointestinal de humanos saudáveis. No entanto, é responsável por diversas infecções oportunistas, não apenas em lesões pequenas da mucosa, mas também infecções sistêmicas com alto risco de vida para pacientes imunocomprometidos (Buchheidt *et al.*, 2000). As infecções associadas a estes variam de micoses superficiais a candidíases sistêmicas. O amplo espectro de infecções associadas a *C. albicans* é atribuído à sua capacidade de alternar entre a forma unicelular de levedura de brotamento para multicelular, micelial filamentosa ou hifálica (Felk *et al.*, 2002).

A patogenicidade de *C. albicans* está relacionada com a sua capacidade para formar um biofilme na superfície do hospedeiro ou em superfícies abióticas (implantes), levando a altas morbidades e mortalidades (Tsui *et al.*, 2016). Como *C. albicans* faz a transição morfológica de levedura para hifas, seu biofilme é uma estrutura complexa de diferentes formas morfológicas (Priya & Pandian, 2020).

### 2.3. Biofilmes

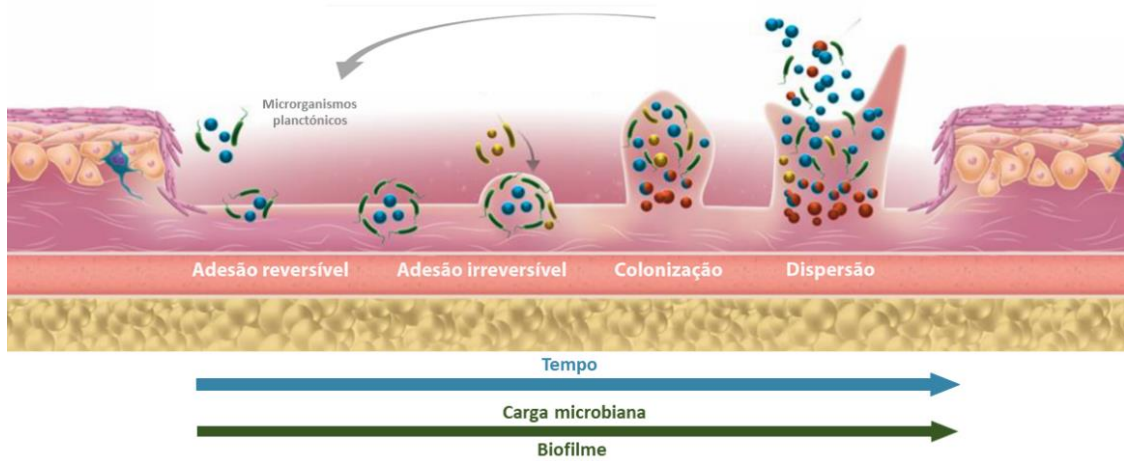
Durante a maior parte da história da microbiologia, os microrganismos eram principalmente caracterizados como células planctônicas, livremente suspensos e descritos com base nas suas características de crescimento em meios de cultura nutricionalmente ricos. A redescoberta de um fenômeno microbiológico, descrito pela primeira vez por Anton Von Leeuwenhoek, de que os microrganismos se fixam e crescem universalmente em superfícies expostas levou a vários estudos (Donlan, 2002). Deste então descobriu-se que, em todos os ambientes, os microrganismos existem naturalmente em pelo menos um dos dois estados principais. Estes incluem um estado de vida livre ou planctônico e um estado ligado ou sésil, no qual os microrganismos se ligam uns aos outros (Percival *et al.*, 2015). No entanto, foi demonstrado que os microrganismos têm preferência por se ligarem uns

aos outros, formando os chamados agregados de biofilme (Burmølle *et al.*, 2010). Desta forma, os biofilmes são definidos como uma comunidade de microrganismos que estão ligados a uma superfície, ou um grupo de microrganismos formando agregados microbianos, incorporados numa matriz de polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, lípidos, DNA extracelular e água, referida como substâncias poliméricas extracelulares (SPEs) (Espinosa *et al.*, 2020; Grant & Hung, 2013).

Um biofilme confere às bactérias certas habilidades que estão ausentes na sua forma planctónica de vida livre. Este fornece um lar microbiano para os organismos colonizadores, criando um ambiente físico-químico apropriado e protegendo o hospedeiro, o meio ambiente e outras espécies concorrentes. Os microrganismos existentes num biofilme são 1000-1500 vezes mais resistentes aos antibióticos do que no seu estado planctónico, e a sua complexidade estrutural proporciona um arranjo espacial ideal, para facilitar o fluxo de nutrientes e a eliminação de resíduos (Chandra *et al.*, 2001; García-Sánchez *et al.*, 2004; Socransky & Haffajee, 2002).

### 2.3.1. Formação de Biofilmes

A formação do biofilme compreende várias etapas, incluindo a adesão reversível inicial, seguida pela adesão irreversível, colonização e dispersão (**Figura 8**). A fixação de um microrganismo a uma superfície é facilitada por fatores como, forças de cisalhamento aumentadas, motilidade microbiana e forças eletrostáticas entre a célula e a superfície. Pensa-se que a etapa de adesão reversível da formação do biofilme seja um equilíbrio de microrganismos aderentes e planctónicos (Lindsay & von Holy, 2006). Fatores como a presença de fimbrias e de flagelos, a hidrofobicidade e a produção de SPEs desempenham um papel significativo na adesão irreversível de microrganismos a uma superfície (Donlan & Costerton, 2002; O'toole *et al.*, 2000). Após o estabelecimento de um biofilme "maduro", células individuais podem-se desprender do biofilme, deslocar e colonizar um novo local. Este mecanismo é conhecido como "dispersão" e é um processo pelo qual os microrganismos dentro de uma microcomunidade relativamente estática e de crescimento lento tornam-se altamente diferenciados e móveis (McDougald *et al.*, 2012).



**Figura 8.** Etapas de desenvolvimento de um biofilme. Adaptado de Pouget *et al.*, 2020

## 2.4. Estratégias de Tratamento

### 2.4.1. Tratamentos Atuais para UPs

O tratamento de UPs depende muito da gravidade da ferida, localização anatômica, mobilidade do paciente e claro, da saúde geral do paciente (Nursing *et al.*, 2005). Assim, o uso de estratégias de tratamento como reposicionamento, desbridamento e terapia de pressão negativa (TPN) têm sido usadas em várias etapas do desenvolvimento de UPs (Levine *et al.*, 2013).

#### 2.4.1.1. Reposicionar

O reposicionamento é a estratégia mais comum na prevenção e tratamento de UPs. Muitos estudos avaliam a eficácia de vários métodos de reposicionamento, como a frequência ou o ângulo de reposicionamento. Por exemplo, o reposicionamento de pacientes com 80 anos ou com UPs de estágio 1 e 2, usando a inclinação de 30 ° com intervalos de três horas por noite, mostrou-se clinicamente mais eficaz quando comparado à prevenção rotineira de seis horas de reposicionamento usando uma rotação lateral de 90 ° (Moore *et al.*, 2011). Embora amplamente utilizado, no entanto, ainda existem discrepâncias na quantidade de evidências para apoiar o reposicionamento na prevenção de UPs. Rich *et al.*, 2011 avaliaram a associação entre o reposicionamento frequente e a prevenção de UPs num estudo de 3 anos. Os autores estabeleceram uma falta de correlação entre o reposicionamento frequente (a cada duas horas) e a prevenção de UPs em pacientes idosos com fratura de quadril acamados.

### 2.4.1.2. Desbridamento

O método de desbridamento periódico é considerado uma maneira eficaz de remover tecido necrótico, detritos celulares, microrganismos e biofilmes (R.D. Wolcott *et al.*, 2009). O desbridamento de UPs pode ser obtido usando várias estratégias, como:

- **Biológicas:** Através da aplicação de larvas, removendo eficazmente o tecido necrótico;
- **Autolítico:** Pelo uso de enzimas naturais que decompõem o tecido morto;
- **Químico:** Utilização de compostos químicos, como o hipoclorito;
- **Enzimático:** Pela aplicação de preparações de desbridamento enzimático, como a colagenase e papaína, que ajudam na degradação de tecido necrótico;
- **Mecânico:** O desbridamento mecânico abrange uma variedade de implementos, desde o uso de curativos até à remoção cirúrgica de tecido necrótico.

Apesar da diversidade de métodos de desbridamento, não há ensaios clínicos para apoiar qual destes métodos é o mais eficaz no desbridamento de feridas (Levine *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013).

### 2.4.1.3. Terapia de Pressão Negativa (TPN)

A terapia de pressão negativa (TPN), em que é aplicado vácuo a um curativo selado, é um método usado para reduzir a carga microbiana, aumentar o fluxo sanguíneo e reduzir o edema, essencialmente promovendo a cicatrização da ferida (Levine *et al.*, 2013). No entanto, a eliminação da carga biológica e a redução do edema foram observadas (Mouës *et al.*, 2011).

### 2.4.1.4. Curativos

Uma diversidade de curativos são usados no tratamento de feridas crônicas, cujo objetivo é controlar a biocarga da ferida e do exsudato (produção de fluido). No entanto, a seleção do curativo utilizado deve depender das características clínicas da ferida; avaliando assim fatores como níveis de exsudato, presença de tecido necrótico, presença de tunelamento, biocarga microbiana e a necessidade de proteção contra o ambiente externo. Opções de curativos para feridas, como hidrocolóides, hidrogéis e espumas, são utilizados no tratamento de UPs, em oposição aos curativos mais tradicionais, como gazes (Nursing *et al.*, 2005). Num estudo envolvendo 27 pacientes com lesão medular apresentando UPs, a eficácia de um curativo de hidrogel foi comparada com gaze tópica com iodopovidona. Embora as taxas de cura nos pacientes tratados com hidrogel tenham sido maiores do que nos tratados com gaze, os resultados foram considerados não significativos. No entanto, houve uma diferença significativa na

epitelização das UPs tratadas com hidrogel em comparação com as tratadas com gaze (A. Z. Kaya *et al.*, 2005).

#### 2.4.1.5. Nutrição e Uso de Vitaminas

O efeito da ingestão alimentar na cicatrização de UPs tem sido estudada. Desta forma, num estudo de Ohura *et al.*, 2011 demonstrou-se que, em pacientes com UPs de estágios 3 ou 4 com a ingestão calórica aumentada, verificou-se uma diminuição significativa do tamanho da ferida. Além disso, o tratamento tópico ou oral de UPs com vitaminas e minerais demonstrou ter um efeito positivo na cicatrização de feridas. Já num estudo controlado e aleatório muito antigo de T.V. Taylor *et al.*, 1974 mostrou-se uma redução na área das UPs em pacientes tratados com 500 mg de ácido ascórbico (vitamina C), duas vezes ao dia durante quatro semanas.

#### 2.4.1.6. Agentes Antibacterianos

Muitos estudos têm revelado que, vários antibióticos bacteriostáticos e bactericidas podem ajudar na cicatrização de feridas, mas a sua influência positiva na reparação fisiológica é regularmente desconhecida, mesmo que, inúmeros antibióticos sejam conhecidos por serem eficazes contra microrganismos causadores de infecções, apenas quinolonas, tetraciclina, aminoglicosídeos e cefalosporinas têm sido aplicados para curativos antimicrobianos. Assim, estas classes de antibióticos, podem obstruir algumas funções e/ou caminhos metabólicos da bactéria, por meio de quatro vias a seguir: inibição da síntese da parede celular, bloqueio de vias metabólicas importantes, interferência na síntese de proteínas e inibição da síntese de ácidos nucleicos (Etebu & Ariekpar, 2016; Kohanski *et al.*, 2010).

Embora muitos antibióticos sejam úteis no tratamento de feridas infetadas, o seu uso consecutivo e/ou inadequado pode promover resistência bacteriana (Kon & Rai, 2016). Tem-se vindo a verificar que, cerca de 70 % das bactérias que causam infecções de feridas são resistentes a, no mínimo, um dos antibióticos mais comumente usados (Friedman *et al.*, 2016). Segundo o estudo de Balasoiu *et al.*, 1990, onde se verificou que, em 470 amostras de secreções de feridas com identificação bacteriológica, as estirpes *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram ambas significativamente resistentes à aplicação de antibióticos. Além disso, estirpes infecciosas têm vindo a revelar resistência a quase todas as classes de antibióticos, levando a uma necessidade imperiosa de encontrar novos substitutos de cura, como óleos essenciais (OEs) (Parsaeimehr & Lutz, 2016) e nanopartículas (NPs) (Kon & Rai, 2016).



## Capítulo 3. Materiais e Métodos

---

### 3.1. Preparação de Meios de Cultura

Para a realização deste estudo foi necessário a preparação de seis meios fornecidos pela *Liofilchem*<sup>®</sup>, Roseto degli Abruzzi, Itália, sendo estes, “*Tryptone Soy Broth*” (TSB), “*Tryptic Soy Agar*” (TSA), “*Sabouraud Dextrose Broth*” (SDB), “*Sabouraud Dextrose Agar*” (SDA), “*Mannitol Salt Agar*” (MSA) e “*Cetrimide Agar*”. Foram também preparados os meios “*Pseudomonas Isolation Agar*” (PIA) e “*Roswell Park Memorial Institute*” 1640 (RPMI 1640), fornecidos respetivamente pela *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha e pela *MP Biomedicals*<sup>®</sup>, Illkirch, França.

Todos estes meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e, após a sua preparação, todos à exceção do meio RPMI 1640, foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C, durante 15 min (autoclave Raypa<sup>™</sup> AE-75-DRY). Este último, foi esterilizado através de um processo de filtração com membrana de 0,22 µm, fornecida pela *Fisherbrand*<sup>®</sup> e mantido a temperaturas entre os 2 °C a 8° C (Bomba de vácuo ME 4 NT).

#### 3.1.1. Meios de Cultura Líquidos

Dos meios de cultura preparados, três eram meios líquidos, o TSB, o SDB e o RPMI 1640. O meio TSB (30 g/L) foi preparado com 200 mL de água destilada (dH<sub>2</sub>O) e TSB (6 g) (*Pancreatic Digest of Casein* 17,0 g/L; *Papaic Digest of Soya Bean* 3,0 g/L; *Glucose Monohydrate* 2,5 g/L; *Sodium Chloride* 5,0 g/L e *Dipotassium Hydrogen Phosphate* 2,5 g/L). O meio SDB (30 g/L) foi preparado com 200 mL de dH<sub>2</sub>O e SDB (6 g) (*Pancreatic Digest of Casein* 5,0 g/L; *Peptic Digest of Animal Tissue* 5,0 g/L e *Dextrose* 20,0 g/L). Por último, o meio RPMI 1640 foi preparado com 1000 mL de água ultrapura, RPMI 1640 (10,4 g), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, 2 g) (*Fisher Chemical*<sup>®</sup>, Leicester, UK) e ácido 4-morfolinopropanossulfônico (MOPS, 34,53 g) (*Duchefa Biochemie BV*, RV Haarlem, The Netherland), sendo depois ajustado a pH 7,0.

#### 3.1.2. Meios de Cultura Sólidos

Os meios sólidos usados neste estudo foram preparados de acordo com o fabricante e plaqueados em placas de *Petri*. Preparou-se TSA com TSB 30 g/L (24 g), agar 20 g/L (16 g) e 800 mL de dH<sub>2</sub>O. O TSA+Voriconazol (VCZ, *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha) [550 µg/mL] foi preparado com TSB 30 g/L (6 g), agar 20 g/L (4 g), 200 mL de dH<sub>2</sub>O e 20 µL de voriconazol 5500 µg/mL. O

TSA+Anfotericina B (ANB) [31,25 mg/L] foi preparado com TSB 30 g/L (3 g), agar 20 g/L (2 g), 100 mL de dH<sub>2</sub>O e 156 µL de anfotericina B (*European Pharmacopoeia Reference Standard, Estrasburgo, França*) 0,00025 g/mL. O SDA foi preparado com SDB 30 g/L (24 g), agar 20 g/L (16 g) e 800 mL de dH<sub>2</sub>O e o SDA+Gentamicina (GEN, *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha) [30mg/L] preparado com SDB 30 g/L (6 g), agar 20 g/L (4 g), 200 mL de dH<sub>2</sub>O e 100 µL de gentamicina 0,06 g/mL. Preparou-se PIA com 98 mL de dH<sub>2</sub>O, 2 mL de glicerol e PIA (4,503 g) (*Agar 13,6 g/L, Magnesium Chloride 1,4 g/L, Peptic Digest of Animal Tissue 20 g/L, Potassium Sulfate 10 g/L, Triclosan 0,025 g/L*) e MSA com 100 mL de dH<sub>2</sub>O e MSA 111 g/L (11,1 g) (*Pancreatic Digest of Casein 5,0 g/L; Peptic Digest of Animal Tissue 5,0 g/L; Beef Extract 1,0 g/L; D-Mannitol 10,0 g/L; Sodium Chloride 75,0 g/L; Phenol Red 0,025 g/L e Agar 15,0 g/L*). O meio Cetrimida Agar foi preparado com 99 mL de dH<sub>2</sub>O, 1 mL de suplemento de glicerol e cetrimida agar em pó (4,72 g) (*Pancreatic Digest of Gelatin 20,0 g/L; Magnesium Chloride 1,4 g/L; Dipotassium Sulphate 10,0 g/L; Cetrimide 0,3 g/L e Agar 15,0 g/L*).

### 3.2. Preparação de Soluções

Para a realização das lavagens para preparação das suspensões celulares e recolha de células de biofilme foram usadas duas soluções. Para a lavagem das espécies de *Candida*, recorreu-se ao uso de uma solução de “*Phosphate-Buffered Saline*” (PBS) e para a recolha, diluições e quantificação de células de biofilme foi usada uma solução de cloreto de sódio (NaCl, 0,9 %) (*J.T.Baker*<sup>®</sup>).

Para a preparação da solução de PBS 1x, a 900 mL de dH<sub>2</sub>O, adicionou-se 100 mL de uma solução de PBS 10x (800 mL dH<sub>2</sub>O, 80 g de NaCl, 2,0 g de KCl, 14,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). A solução foi devidamente agitada até todos os reagentes estarem completamente dissolvidos, tendo sido depois ajustada a pH 7,5 e autoclavada a 121 °C, por 15 min.

A solução de NaCl 0,9 % foi preparada pela adição de 400 mL dH<sub>2</sub>O a 3,6 g de NaCl e esterilização por autoclavagem a 121 °C, durante 15 min.

### 3.3. Microrganismos e Condições de Crescimento

Para a realização deste estudo foram utilizados quatro microrganismos de referência, nomeadamente duas bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e duas espécies de *Candida* (*Candida parapsilosis* e *Candida albicans*). As estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foram cultivadas *overnight* em TSB a 37 °C e sob agitação de 120 rpm. Por sua vez, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida albicans* SC5314, foram cultivadas *overnight* em SDB a 37 °C, sob agitação a 120 rpm.

### 3.4. Preparação das Suspensões Celulares

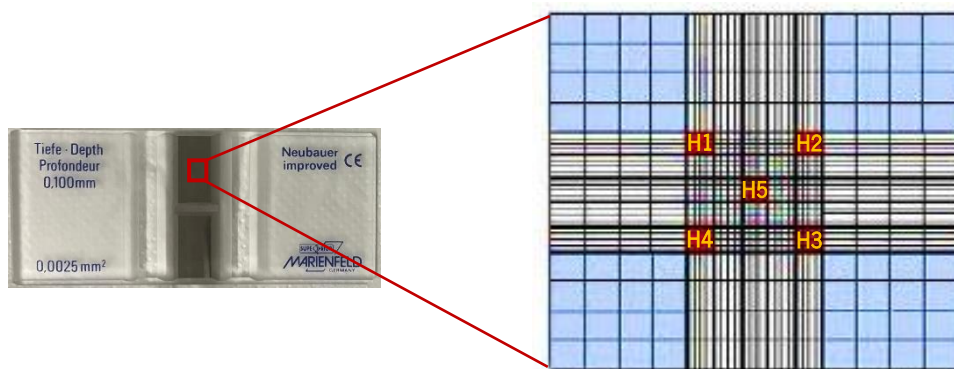
Para os ensaios de formação de biofilmes foi necessário ajustar a concentração celular de cada um dos microrganismos em estudo. Assim, após o período de incubação, dependendo do tipo de microrganismo, bactéria ou fungo, foram seguidos os protocolos referidos nos pontos 3.4.1. e 3.4.2..

#### 3.4.1. Bactérias

Após o período de incubação, os inóculos de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram centrifugados (Centrifuge 5430 R, *Eppendorf*) a 5000 rpm e a 4 °C durante 10 min. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em meio de cultura e posteriormente feita a leitura do valor da densidade ótica (DO) a 620 nm no leitor de placas ELISA (Multiskan FC, *Thermo Scientific*). As seguintes retas de calibração da DO em função do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL) foram utilizadas de forma a ajustar a suspensão celular para a concentração final pretendida para cada ensaio (*S. aureus*:  $DO_{620\text{ nm}} = (4 \times 10^{-10} \pm 1,5 \times 10^{-10}) \text{ UFC/mL} - (0,08 \pm 0,09)$ ; *P. aeruginosa*:  $DO_{620\text{ nm}} = (9 \times 10^{-10} \pm 1,8 \times 10^{-10}) \text{ UFC/mL} - (0,03 \pm 0,09)$ ).

#### 3.4.2. Fungos

Após incubação, o inóculo de cada uma das espécies de *Candida* estudadas foi centrifugado a 5000 rpm e a 4 °C durante 10 min. O *pellet* obtido foi ressuspensão num volume de 10 mL de uma solução de lavagem (PBS) e centrifugado nas condições anteriores. Este passo de lavagem foi repetido duas vezes. Após lavagens, o *pellet* obtido foi ressuspensão em 5 mL de meio de cultura e, posteriormente, realizou-se uma diluição de 1:100 para se proceder à contagem de células usando uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Alemanha). Para a contagem das células de *Candida* spp foram usados cinco campos de contagem denominados de H1, H2, H3, H4 e H5 (**Figura 9**).



**Figura 9.** Câmara de Neubauer e representação da área usada na contagem de células de *Candida* spp.

Com a contagem das células tornou-se possível determinar a concentração inicial da suspensão fúngica, por forma a conseguir-se acertar a suspensão celular para a concentração final pretendida para cada ensaio. Para o cálculo da concentração inicial da suspensão celular recorreu-se à **Equação 1**, no qual o fator de diluição usado foi de 100 e o volume do quadrado  $5 \times 10^{-4}$  mL.

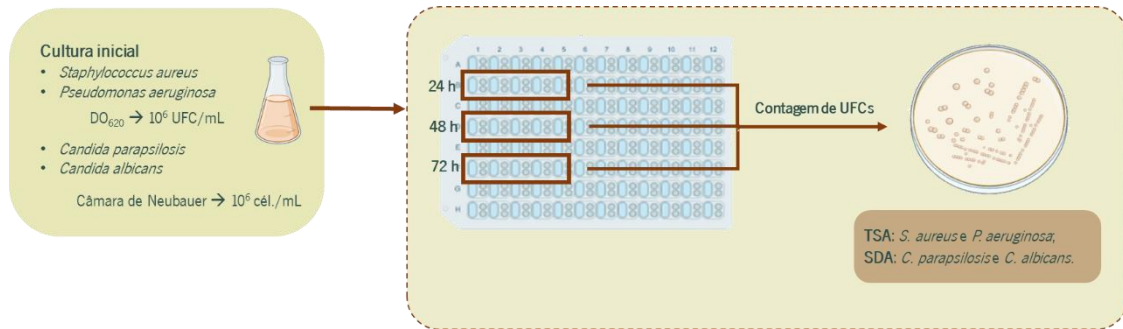
$$\text{Concentração celular (cél./mL)} = \frac{\text{média do N}^\circ \text{ de células}}{\text{volume do quadrado}} \times \text{fator de diluição} \quad \text{Equação 1}$$

### 3.5. Biofilmes Simples

Para a formação de BSs foi usada uma microplaca de 96 poços, na qual foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica/bacteriana ( $10^5$  cél.-UFC/mL), em 5 poços para cada tempo de incubação. As placas foram incubadas a 37 °C com agitação a 120 rpm, durante 24 h, 48 h e 72 h. Para biofilmes de mais de 24 h o meio foi trocado de 24 em 24 h.

#### 3.5.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme ao Longo do Tempo

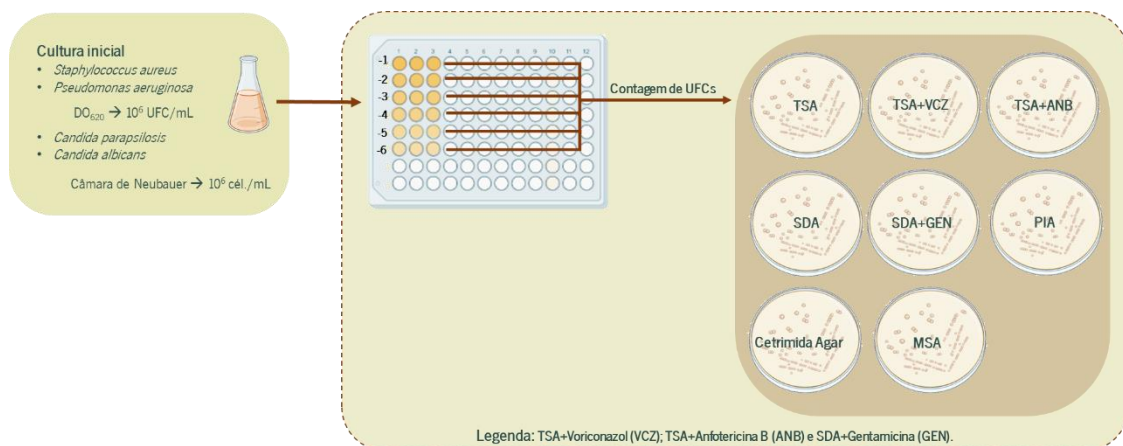
Após a formação do biofilme, a fração planctónica de cada poço da placa foi removida suavemente e descartada. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl 0,9 % foi adicionada a cada poço e os biofilmes foram raspados com recurso a uma ponta de micropipeta. A fim de garantir a reprodutibilidade do método de raspagem, as condições foram estritamente seguidas em todos os poços raspando cada poço durante 1 min. Durante a execução das sucessivas raspagens e lavagens, as suspensões celulares foram recolhidas num *Eppendorf* (volume final de 1000  $\mu\text{L}$ ) e com a ajuda do *vortex*, homogeneizou-se a amostra. Seguidamente, procedeu-se a diluições de 1:10 em NaCl 0,9 % e 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram plaqueados em meios sólidos (TSA para *S. aureus* e *P. aeruginosa*; SDA para *C. parapsilosis* e *C. albicans*). As placas foram posteriormente incubadas 24 e 48 h a 37 °C e a contagem do número de UFCs foi registada. Estes ensaios foram realizados em triplicados e para dois ensaios independentes. A metodologia descrita acima está representada na **Figura 10**.



**Figura 10.** Representação esquemática do trabalho elaborado para a quantificação de UFC/mL de biofilmes simples (BSs) ao longo do tempo.

### 3.6. Meios de Cultura Seletivos

Para realizar o estudo da interação entre bactéria-bactéria/bactéria-*Candida* em biofilmes duplos e triplos foi necessário a otimização de diferentes meios seletivos. Para tal, a concentração dos inóculos dos microrganismos em estudo foi ajustada para 10<sup>6</sup> cél.-UFC/mL. De seguida, a suspensão celular obtida foi diluída (diluições em série de 1:10) e as respetivas diluições (10 µL), plaqueadas em oito meios seletivos diferentes, sendo estes TSA, TSA+VCZ, TSA+ANB, SDA, SDA+GEN, PIA, Cetrimida Agar e MSA (Figura 11). Por fim, foi feita a contagem das UFCs nos diferentes meios e os valores registados.

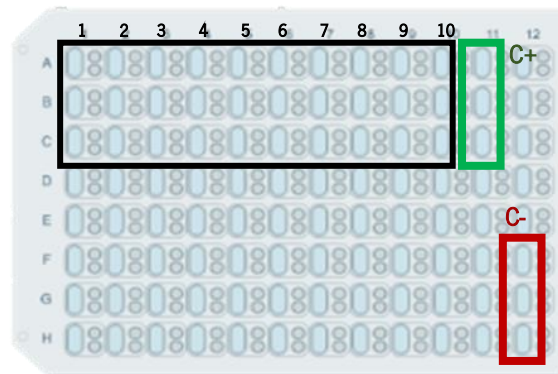


**Figura 11.** Representação esquemática do trabalho elaborado para a otimização de meios seletivos.

#### 3.6.1. Otimização do Meio TSA+ANB

O valor da concentração mínima inibitória (CMI) da anfotericina B para *C. albicans* foi determinado em triplicado, pelo método de microdiluição, utilizando uma placa de 96 poços, de acordo com a metodologia do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015). Para a determinação da CMI foi necessário ajustar a concentração celular de modo que, a concentração final da *C. albicans* fosse de 2×10<sup>6</sup> cél./mL.

As concentrações de ANB testadas foram as seguintes: 0,24 (10); 0,49 (9); 0,98 (8); 1,95 (7); 3,90(6); 7,80 (5); 15,63 (4); 31,25 (3); 62,5 (2) e 125 mg/L (1). As mesmas foram preparadas a partir de uma solução *stock* de 250 mg/L. Após a preparação da placa de 96 poços com as diferentes concentrações de ANB a testar (2x a concentração de antifúngico pretendida), adicionou-se 100 µL da suspensão celular tendo-se obtido uma concentração celular final de  $1 \times 10^6$  cél./mL. Foram realizados controlos negativos e positivos, sendo o controlo negativo (C-) meio SDB e o controlo positivo (C+) suspensão celular sem tratamento antifúngico. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C (Figura 12). Posteriormente, visualizou-se a turbidez dos poços. Determinou-se ainda a concentração mínima fungicida (CMF) por determinação de UFC/mL para concentração igual ou superior à CMI. A CMF foi estabelecida como a concentração mínima à qual não existe crescimento fúngico em meio sólido (Nikaein *et al.*, 2018). De acordo, foram retiradas amostras dos respetivos poços e plaqueadas em placas de SDA. As placas foram incubadas por 24 e 48 h, a 37 °C e posteriormente determinada a CMF. Este ensaio foi realizado em três ensaios independentes.



**Figura 12.** Teste de microdiluição para determinação da CMI e CMF da *C. albicans* à anfotericina B (ANB) realizado em placa de 96 poços, por 24 h, a 37 °C. 1 a 10 - gama de concentrações decrescente de ANB; C+ - controlo positivo; C- - controlo negativo.

### 3.7. Biofilmes Duplos

#### 3.7.1. Biofilmes Duplos Bactéria-*Candida*

##### 3.7.1.1. Formação de Biofilmes de *S. aureus* e *Candida* spp

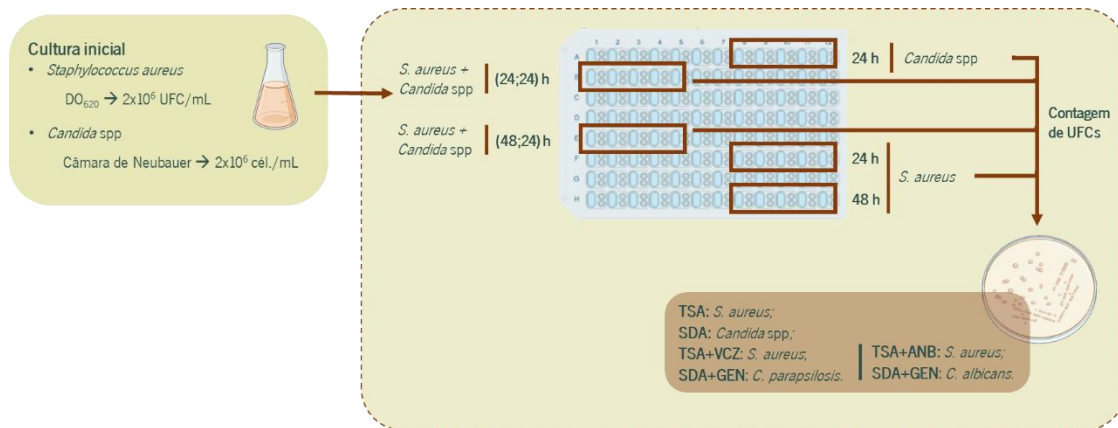
Após incubação *overnight* de *Candida* spp e *S. aureus*, a suspensão celular de cada estirpe foi ajustada para  $2 \times 10^6$  cél.-UFC/mL. Em seguida, com o recurso a placas de 96 poços, foram realizados os seguintes biofilmes: BDs de *S. aureus* e *Candida* (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, BSs de 24 h de *Candida* spp e BSs de *S. aureus* com tempos de formação diferentes, 24 h e 48 h.

Deste modo, para realização das condições em estudo, BDs *S. aureus* e *Candida* spp com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* (48 h;24 h), colocou-se em 5 poços de uma placa de 96 poços 100 µL da suspensão de *S. aureus* e 100 µL de RPMI 1640. A placa foi incubada a 120 rpm, 37 °C e 24 h. Após este período de preformação do biofilme, o meio de cada poço foi gentilmente retirado e adicionado 200 µL da suspensão celular de *Candida* spp na concentração de  $1 \times 10^6$  cél./mL (BDs com preformação); e em 5 novos poços colocou-se 100 µL da suspensão de *S. aureus* e 100 µL da suspensão de *Candida* spp (BDs sem preformação) (24 h;24 h). Como controles foram usados BSs dos microrganismos testados. Para tal, em 5 poços de uma das placas adicionou-se 100 µL de *Candida* spp e 100 µL de RPMI 1640, por forma a obter os BSs de 24 h *Candida* spp e numa outra placa de 96 poços adicionou-se em 10 poços 100 µL de *S. aureus* e 100 µL de RPMI 1640, com o objetivo de formar os BSs de 24 h *S. aureus* (5 poços) e os BSs de 48 h *S. aureus* (5 poços). Posteriormente, as placas de 96 poços foram incubadas a 120 rpm, durante 24 h e 48 h (BS 48 h *S. aureus*) a 37 °C.

#### 3.7.1.1.1. Estudo de Fatores de Virulência de *Candida* spp

##### 3.7.1.1.1.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme de *Candida* spp em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *Candida* spp

Após a formação do biofilme, a fração planctónica de cada poço da placa foi retirada suavemente e descartada. De forma a recolher as células aderidas aos poços, e quantificar as células de biofilme de cada microrganismo em estudo, foi usado o mesmo protocolo descrito no ponto 3.5.1.. As células de biofilme foram plaqueadas em TSA para o caso dos BSs de 24 h e 48 h de *S. aureus*, em SDA para os BSs de 24 h de *Candida* spp e em SDA+GEN e TSA+VCZ para os BDs de *S. aureus* e *C. parapsilosis* e TSA+ANB e SDA+GEN para os BDs de *S. aureus* e *C. albicans*. Por fim, as placas foram incubadas por 24 e 48 h, a 37 °C e posteriormente, a contagem do número de UFCs foi registada. Estes ensaios foram realizados em triplicados e para três ensaios independentes. A metodologia descrita acima está representada na **Figura 13**.



**Figura 13.** Representação esquemática do trabalho elaborado para a formação de biofilmes duplos (BDs) de *S. aureus* e *Candida spp.*

### 3.7.1.1.1.2. Estudo da Capacidade de Filamentação de *Candida spp* em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *Candida spp*

A filamentação de *Candida spp* foi estudada utilizando as suspensões recorridas das células aderidas aos poços de BSs e de BDs com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, numa concentração celular de  $10^5$  cél./mL. Para um volume de 10  $\mu$ L, procedeu-se à contagem na câmara de Neubauer (25 campos de contagem) das células filamentadas e não filamentadas. Por conseguinte, fez-se uma extrapolação para 1 mL e os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem (%) das células com formas filamentosas, como descrito na **Equação 2**.

$$\% \text{ Filamentação} = \frac{N^{\circ} \text{ de células filamentosas}}{N^{\circ} \text{ total de células}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

## 3.7.2. Biofilmes Duplos Bactéria-Bactéria

### 3.7.2.1. Formação de Biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Para o estudo de biofilmes duplos envolvendo duas bactérias, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, após incubação *overnight*, as suspensões celulares de ambos os microrganismos foram ajustadas para  $2 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, de forma a proceder-se à formação dos biofilmes em estudo: BDs de *S. aureus* e *P. aeruginosa* com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, BSs de *S. aureus* com tempos de formação diferentes, 24 h e 48 h e os BSs de 24 h de *P. aeruginosa*, foi usado o mesmo protocolo que descrito no ponto 3.7.1.1., apenas com a diferença que a estirpe *Candida spp* foi substituída por *P. aeruginosa*.

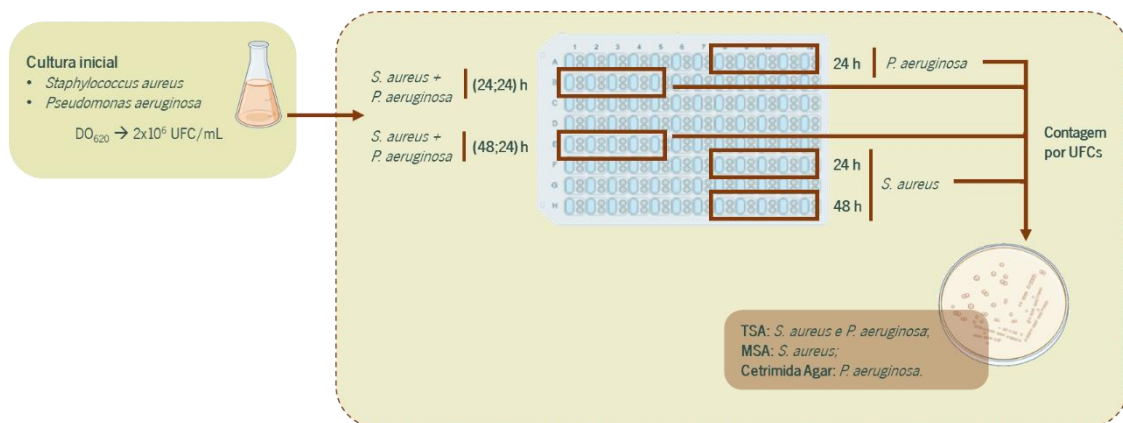
Para BSs de 48 h de *S. aureus*, após 24 h de incubação o meio foi substituído por RPMI 1640 fresco e nos poços para estudo de BDs com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, após o período de preformação (24 h) a cada poço adicionou-se 200  $\mu$ L de suspensão celular de *P. aeruginosa*



acertada a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas durante 24 h a 37 °C a 120 rpm.

### 3.7.2.1.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme de *P. aeruginosa* em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

De igual forma ao anteriormente realizado para os BDs bactéria-*Candida*, após os tempos de incubação definidos, a fração aderida aos poços, foi raspada e recolhida. De seguida, a suspensão celular obtida foi diluída (diluições em série de 1:10) e as respetivas diluições (10  $\mu$ L), plaqueadas em TSA para os BSs de *S. aureus* e de *P. aeruginosa* e em Cetrimida Agar e MSA para os BDs de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Por fim, as placas foram incubadas por 24 h, a 37°C e posteriormente, a contagem do número de UFCs foi registada. Estes ensaios foram realizados em triplicados e para três ensaios independentes. A metodologia descrita acima está representada na **Figura 14**.



**Figura 14.** Representação esquemática do trabalho elaborado para a formação de biofilmes duplos (BDs) de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

## 3.8. Biofilmes Triplos

### 3.8.1. Formação de Biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp

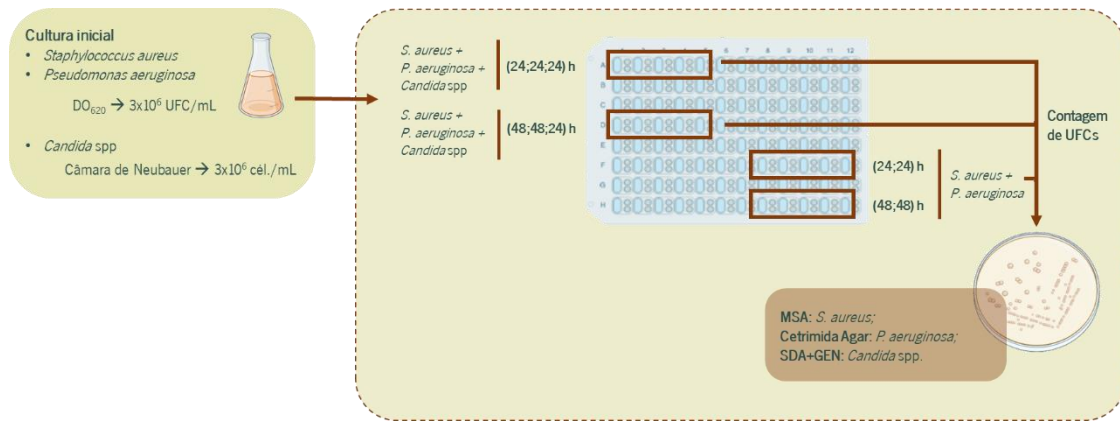
De forma a estudar os fatores de virulência das *Candida* spp em estudo, capacidade de formação de biofilme e de filamentação, quando crescidas em BTs com e sem preformação de BDs bacterianos (*S. aureus* e *P. aeruginosa*), começou-se por acertar todos os inóculos para  $3 \times 10^6$  cél.-UFC/mL. Em seguida, preparou-se placas de 96 poços para a formação dos seguintes biofilmes: BTs de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp (*C. albicans* ou *C. parapsilosis*) com e sem preformação de BDs de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (48 h;48 h;24 h e 24 h;24 h;24 h, respetivamente) e BDs de *S. aureus* e *P. aeruginosa* com tempos de formação de biofilme diferentes, 24 e 48 h (controlos).

Deste modo, para a formação dos BTs, colocou-se em 5 poços de uma placa de 96 poços 66,7  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de *S. aureus*, 66,7  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de *P. aeruginosa* e 66,7  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 (com preformação). A placa foi incubada a 37 °C, 120 rpm durante 24 h. Após este período de preformação dos biofilmes, o meio de cada poço foi gentilmente retirado e adicionado 200  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de *Candida* spp na concentração de  $1 \times 10^6$  cél./mL (BTs com preformação). Em 5 novos poços colocou-se 66,7  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de *S. aureus*, 66,7  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de *P. aeruginosa* e 66,7  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Candida* spp (sem preformação). Foram também realizados os controlos das bactérias em consórcio usadas para estudar os BTs. Para tal, numa placa de 96 poços foram colocadas as suspensões celulares de *S. aureus* e *P. aeruginosa* numa concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL (5 poços para cada condição estudada, 24 e 48 h). As placas foram novamente incubadas a 120 rpm, 37 °C e durante 24 e 48 h.

#### 3.8.1.1. Estudo de Fatores de Virulência de *Candida* spp

##### 3.8.1.1.1. Estudo da Capacidade de Formação de Biofilme de *Candida* spp em Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp

Após a formação dos biofilmes, a fração planctónica de cada poço foi gentilmente retirada e descartada. Com o intuito de recolher as células aderidas aos poços, os biofilmes foram ressuspensos e raspados em 1 mL de NaCl 0,9 % e a suspensão celular obtida vortexada. De seguida, foram realizadas diluições sucessivas de 1:10 e as respetivas diluições (10  $\mu\text{L}$ ), plaqueadas em meios seletivos dependendo do consórcio em estudo. Foram usados o MSA e Cetrimida Agar para os BDs de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para os BTs de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp foram usados os seguintes meios: MSA, Cetrimida Agar e SDA+GEN. Por fim, as placas foram incubadas por 24 e 48 h, a 37 °C e posteriormente, a contagem do número de UFCs foi registada. Estes ensaios foram realizados em triplicados e para três ensaios independentes. A metodologia descrita acima está representada na **Figura 15**.



**Figura 15.** Representação esquemática do trabalho elaborado para a formação de biofilmes tripos (BTs) de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp.

### 3.8.1.1.2. Estudo da Capacidade de Filamentação de *Candida* spp em Biofilmes Tripos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp

A capacidade de filamentação das duas espécies de *Candida* em estudo, *C. albicans* e *C. parapsilosis* foi estudada e usado o mesmo procedimento descrito na secção 3.7.1.1.1.2..

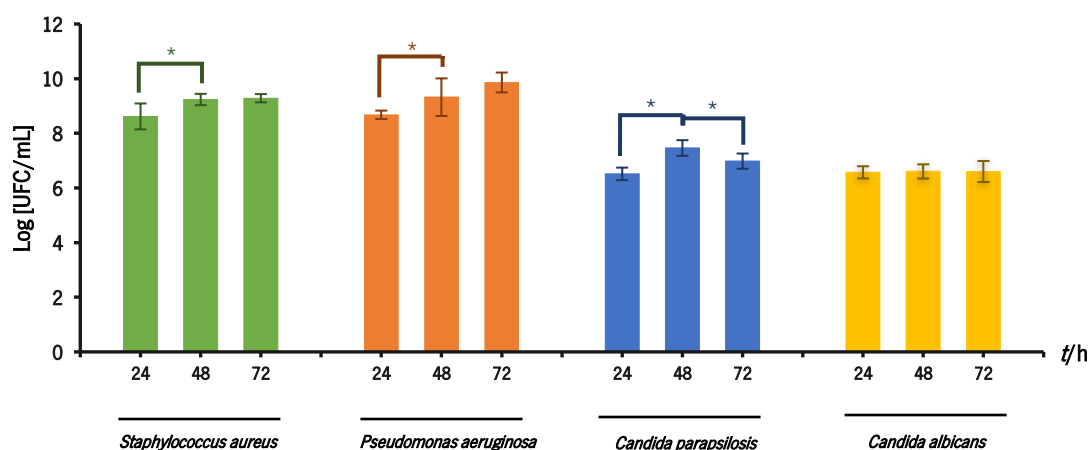
## 3.9. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos realizou-se com recurso ao software *Microsoft Excel*. Os dados relativos ao número de UFCs por mililitro e filamentação, foram comparados pela análise de variância unidirecional (ANOVA). As diferenças entre as condições foram consideradas estatisticamente significativas quando *p-value* < 0,05.

## Capítulo 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Biofilmes Simples

Inicialmente, começou-se por analisar a capacidade de formação de biofilmes de monoespécies de *S. aureus* e *P. aeruginosa* em meio TSB e *C. parapsilosis* e *C. albicans* em SDB ao longo do tempo. Assim, após incubação a 37 °C, 120 rpm e durante 24, 48 e 72 h, a contagem de células presentes nos biofilmes foi efetuada. Os resultados obtidos foram convertidos em valores de logaritmo de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL), e representados na **Figura 16**.



**Figura 16.** Logaritmo de UFC/mL de biofilmes simples de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* após 24, 48 e 72 h de incubação. As barras representam os desvios padrões; \* - indica resultados que são significativamente diferentes, ( $p < 0,05$ ).

Com base nos resultados, foi possível verificar um aumento significativo na capacidade de formação de biofilmes de monoespécies de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis* entre 24 e 48 h ( $p < 0,05$ ).

Após as 48 h, apesar dos biofilmes de monoespécie de *C. parapsilosis* apresentarem diferenças significativas entre 48 e 72 h ( $p < 0,05$ ), os valores de logaritmo de UFC/mL obtidos diminuíram parcialmente de  $(7,46 \pm 0,29)$  para  $(6,98 \pm 0,28)$ . Relativamente à *C. albicans*, esta revelou capacidade de formação de biofilme em 24 h, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada ao longo do tempo ( $p > 0,05$ ).

Vários autores como Oliveira *et al.*, 2007 e Pires *et al.*, 2011 avaliaram a capacidade de formação de BSs de *S. aureus* e *C. parapsilosis* relatando que, o período necessário para produzir um biofilme maduro é de 48 h, o que vai de encontro aos resultados obtidos, uma vez que, a partir das 48 h a variação dos valores de logaritmo de UFC/mL não foi significativa para *S. aureus* e foi significativa, mas

menor para *C. parapsilosis*. No caso de *P. aeruginosa*, autores como Toc *et al.*, 2022 consideraram que 10 h é o tempo necessário para a formação de biofilmes maduros, enquanto que neste estudo verificou-se que até às 48 h existiu um aumento do log de UFC/mL ( $p < 0,05$ ).

Segundo o estudo de Cervantes-Huamán *et al.*, 2022, microrganismos patogênicos de referência que apresentem contagens totais de células aderidas superiores a 7 log UFC/mL, são considerados exibir boa capacidade de formação de biofilmes. Assim, de acordo com este estudo, os quatro microrganismos usados apresentaram uma boa capacidade de formação de biofilmes após as 24 h (log UFC/mL  $\geq 7$ ), tendo sido este tempo de incubação o ponto de partida para os estudos dos biofilmes polimicrobianos.

## 4.2. Otimização de Meios Seletivos

De forma a proceder-se ao estudo de biofilmes polimicrobianos (duplos e triplos), foi necessária a seleção e otimização de meios seletivos e, para tal, todos os microrganismos em estudo foram plaqueados nos seguintes meios: TSA, TSA+VCZ, TSA+ANB, SDA, SDA+GEN, PIA, Cetrimida Agar e MSA. Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Crescimento dos vários microrganismos em estudo em diferentes meios de cultura

	TSA	TSA+VCZ	TSA+ANB [0,50 mg/L]	SDA	SDA+GEN	PIA	Cetrimida Agar	MSA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✗
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✗
<i>Candida albicans</i> SC5314	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗

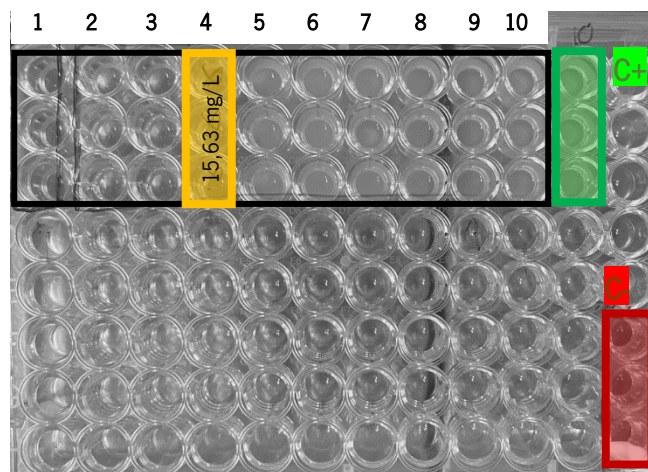
**Legenda:** ✗ Não cresceu ✓ Cresceu

### 4.2.1. Otimização do Meio TSA+ANB

Após a obtenção dos resultados da **Tabela 3**, verificou-se que, o meio seletivo TSA+ANB necessitava ser otimizado, dado que, os resultados previstos teoricamente não foram alcançados. Deste modo, não existia qualquer meio seletivo para selecionar *S. aureus* em biofilmes polimicrobianos com *C. albicans*. De acordo com El-Azizi *et al.*, 2015, a CMI de anfotericina B (ANB) em *C. albicans* (CA04) foi de 0,25 mg/L, e a CMF foi de 0,50 mg/L, valores esses que serviram de apoio à preparação do meio seletivo TSA+ANB (**Tabela 3**).

A suscetibilidade de *C. albicans* SC5314 à ANB foi determinada através da CMI e CMF, usando o método da microdiluição e contagem de UFCs. A CMI de um dado composto é a concentração mínima capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo e permite quantificar a atividade antimicrobiana desse composto (Cantón *et al.*, 2004). Quanto menor for o valor de CMI de um dado composto face a uma dada espécie, maior será a sua efetividade clínica no tratamento de infeções e, por conseguinte, mais suscetível será a espécie a esse mesmo composto (Ansari *et al.*, 2013).

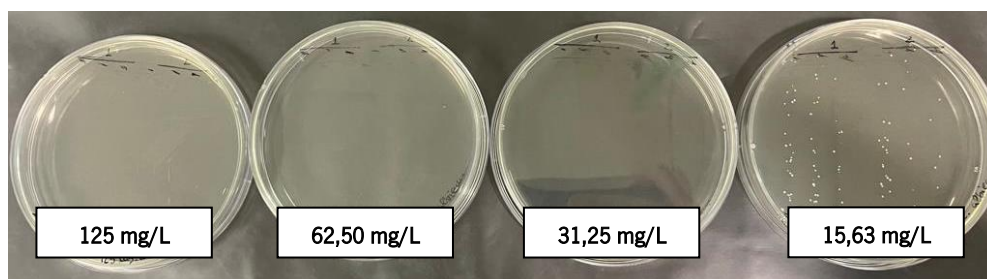
Na **Figura 17** encontra-se o valor da CMI da ANB obtido para células planctónicas de *C. albicans*.



**Figura 17.** Teste de suscetibilidade de *C. albicans* à anfotericina B (ANB).

Os resultados mostraram que a CMI para *C. albicans* foi de 15,63 mg/L, tendo-se verificado que este valor foi 63 vezes maior do que o obtido por El-Azizi *et al.*, 2015.

Aquando da determinação da CMI da ANB foi determinado também o valor da CMF. Para tal, em placas de SDA foram plaqueados os poços que não apresentaram qualquer turbidez, ou seja, os poços correspondentes às concentrações iguais ou superiores à CMI (**Figura 18**).



**Figura 18.** Determinação da CMF da anfotericina B (ANB) em *C. albicans*.

A partir da análise da **Figura 18** foi possível observar que a CMF foi de 31,25 mg/L, tendo-se constatado que, o valor foi 63 vezes maior do que o obtido no estudo de El-Azizi *et al.*, 2015. Esta

concentração foi a usada na preparação do meio seletivo TSA+ANB. Este meio seletivo foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado do meio TSA+ANB otimizado na resposta ao crescimento dos vários microrganismos em estudo

	TSA+ANB [31,25 mg/L]
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	✓
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	✓
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	✓
<i>Candida albicans</i> SC5314	✗

**Legenda:** ✗ Não cresceu ✓ Cresceu

Deste modo, e com esta otimização do meio TSA+ANB conseguiu-se obter todos os meios seletivos necessários à realização dos ensaios com biofilmes polimicrobianos (duplos e triplos) envolvendo as bactérias e fungos em estudo.

### 4.3. Biofilmes Duplos

Tal como mencionado anteriormente, na maioria dos estudos encontrados na literatura sobre colonização de UPs é mencionado que, principalmente bactérias gram-positivas como *S. aureus* são as mais comumente isoladas nas fases iniciais do desenvolvimento de uma ferida crónica, e por isso, *S. aureus* foi usada na preformação de biofilme bacteriano de 24 h. Em fases mais avançadas, são recorrentemente identificadas bactérias gram-negativas como, *P. aeruginosa* e fungos como, *Candida* spp (Cardona & Wilson, 2015; Cereda *et al.*, 2015; Taradaj, 2017b; Wolcott *et al.*, 2016), assim, para a realização das diferentes interações bactéria-*Candida* necessárias para a realização do estudo escolheu-se *P. aeruginosa* e *Candida* spp.

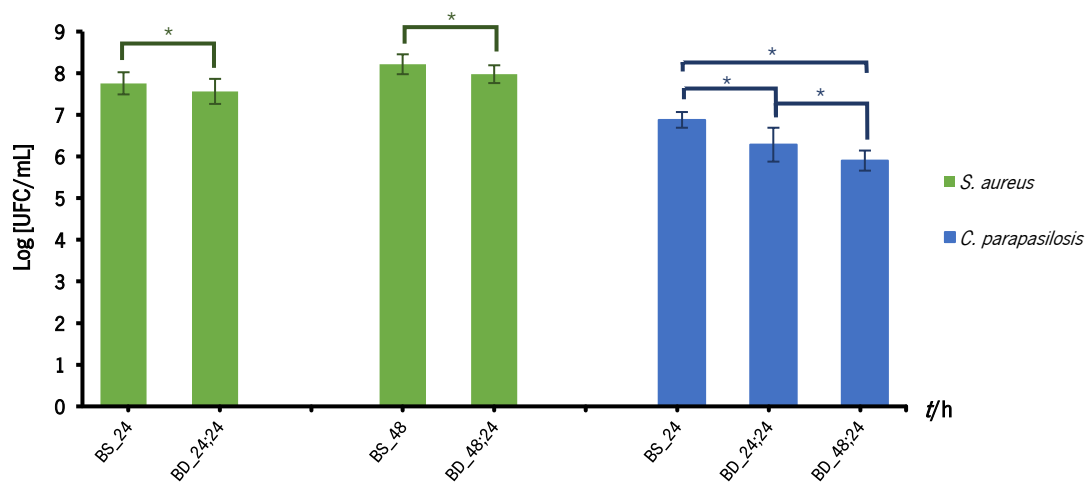
#### 4.3.1. Biofilmes Duplos Bactéria-*Candida*

De forma a estudar como, as interações bactéria-*Candida* e nomeadamente se a preformação de um biofilme bacteriano pode ou não afetar alguns fatores de virulência da *Candida*, avaliou-se a capacidade de formação de biofilme e filamentação de *Candida* spp com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*.

#### 4.3.1.1. Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *C. parapsilosis*

##### 4.3.1.1.1. Capacidade de Formação de Biofilme de *C. parapsilosis* em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *C. parapsilosis*

De acordo com os resultados obtidos anteriormente relativos aos meios seletivos verificou-se que, para o estudo deste consórcio microbiano os meios TSA, SDA, SDA+GEN e TSA+VCZ eram os mais indicados. Após incubação, recolha e contagem das células de biofilmes, os resultados obtidos foram convertidos em valores de logaritmo de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL). Os resultados obtidos estão representados na **Figura 19**.



**Figura 19.** Capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus* e *C. parapsilosis* (biofilmes simples e biofilmes duplos) com (BD\_48;24) e sem preformação (BD\_24;24) de biofilmes de 24 h de *S. aureus*. As barras representam os desvios padrões; \* - indica resultados que são significativamente diferentes, ( $p < 0,05$ ).

Através da análise dos resultados, foi possível verificar que, a capacidade de formação de BSs de *S. aureus* aumentou gradualmente ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ). Foi importante ainda comparar os valores obtidos para BSs e BDs de *S. aureus* para a mesma condição de tempo. Verificou-se que a capacidade de formação de biofilme desta bactéria foi significativamente menor quando em consórcio com *C. parapsilosis* ( $p < 0,05$ ). Relativamente, ao comportamento da *C. parapsilosis* em consórcio com *S. aureus*, para ambas as condições, com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, a capacidade de formação de biofilme foi significativamente menor à obtida para BSs ( $p < 0,05$ ).

Em BDs, têm sido mencionadas diferentes relações entre fungos e bactérias, dependendo das espécies, do local onde ocorre e das condições do ambiente. Relações onde os microrganismos podem coexistir e formar comunidades complexas, ou onde os fungos podem desenvolver suportes bióticos para o estabelecimento de biofilmes bacterianos, ou ainda onde os fungos podem colonizar biofilmes bacterianos pré-estabelecidos. Assim, as relações entre os microrganismos podem desta forma ser,



mutualísticas e endossimbióticas, ou relações competitivas, antagônicas, patogênicas e parasitárias, onde fungos e bactérias estão em competição direta por recursos (Braga *et al.*, 2016; Doggett, 2000; Gonçalves *et al.*, 2006; Seneviratne *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014).

Vários autores, Afonso *et al.*, 2019 e Bautista-Hernández *et al.*, 2019 têm vindo a observar que, quando inoculados simultaneamente, *Penicillium* spp, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Methylobacterium oryzae* ou *Fusarium falciforme* (estirpe IOM 325286) e *Staphylococcus aureus* (estirpe IOM2617228), as bactérias podem inibir ou diminuir a capacidade de filamentação, a formação de biofilme e a germinação de esporos de fungos filamentosos, nas primeiras 24 h de interação. O efeito inibitório às 24 h, pode ser devido à competição direta por nutrientes, à maior taxa de crescimento e atividade metabólica das bactérias, à produção de metabolitos que podem inibir a esporulação fúngica ou a uma combinação de todos estes fatores (Kousser *et al.*, 2019; Mowat *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2019). A competição nutricional entre fungos e bactérias está bem documentada noutros ambientes, por exemplo na rizosfera, onde a competição bacteriana por nutrientes pode ser um mecanismo eficaz de biocontrolo contra fungos patogênicos (Lemanceau *et al.*, 1993; Yigal & Baker, 1985). A ocorrência de múltiplas interações interespecies ou mesmo a simples produção de um metabolito também pode interferir na formação e desenvolvimento do biofilme (Kives *et al.*, 2005; Mowat *et al.*, 2010; Valle *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo, dado que, a associação de *S. aureus* e *C. parapsilosis*, tanto na condição com ou sem preformação de *S. aureus*, diminuiu ligeiramente a capacidade de formação de biofilme de *S. aureus*.

Quanto aos biofilmes de *C. parapsilosis* formados sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, o valor de logaritmo de UFC/mL foi significativamente maior do que com biofilmes preformados de 24 h de *S. aureus* ( $p < 0,05$ ) e portanto este efeito antagónico foi mais evidente no caso dos BDs com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*.

#### 4.3.1.1.2. Capacidade de Filamentação de *C. parapsilosis* em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *C. parapsilosis*

A capacidade de filamentação de *C. parapsilosis* foi avaliada em diferentes condições e os resultados obtidos foram expressos em percentagem de células com formas filamentosas (**Tabela 5**). Este estudo foi realizado em células desagregadas de biofilmes monoespécie e biofilmes duplos.

**Tabela 5.** Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes duplos (BDs) de *C. parapsilosis*

	Condição	(Filamentação ± desvio padrão) %
<i>C. parapsilosis</i>	BS_24	10,36 ± 3,01
	BD_24;24	11,85 ± 6,07
	BD_48;24	17,61 ± 4,93

Vários estudos demonstraram que, *C. parapsilosis* é uma das espécies consideradas menos patogênicas, do que *C. albicans* por uma variedade de razões, incluindo uma reduzida capacidade de aderir às células hospedeiras, secretar enzimas degradativas e formar biofilmes. Estas são geralmente mais sensíveis ao *stress* celular, encontrado no ambiente do hospedeiro e não apresentam filamentação tão rápida ou robusta quanto *C. albicans* (Filler *et al.*, 2002; Priest & Lorenz, 2015). Tal como, já mencionado anteriormente *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras e apenas existem em fase de levedura ou em forma pseudo-hifal (Laffey & Butler, 2005). Assim, contrariamente ao referido, verificou-se que, neste estudo, em BDs e BSs *C. parapsilosis* apresentou ser melhor formadora de biofilmes.

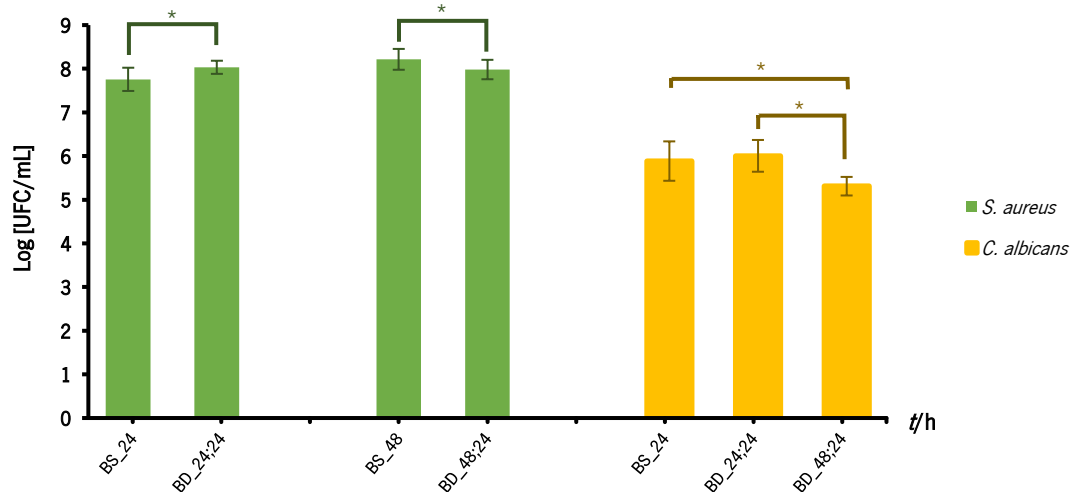
A partir da análise da **Tabela 5** foi possível observar que, estes mostraram estar em concordância com o mencionado pelos autores, uma vez que, *C. parapsilosis* exibiu formas pseudo-filamentosas e formas de levedura sendo que, a percentagem de células com formas pseudo-filamentosas foi menor que 50 % em todas as condições estudadas, apresentando-se *C. parapsilosis* predominantemente na forma de levedura.

Para as diferentes condições analisadas não existiram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no que diz respeito ao número de células com formas pseudo-filamentosas, o que poderá sugerir que a presença de formas pseudo-filamentosas não foi influenciada pela presença de *S. aureus*. Num estudo de Bautista-Hernández *et al.*, 2019, demonstraram que, a presença de uma bactéria, nomeadamente *S. aureus* promoveu a diminuição da filamentação e a formação de biofilme em *F. falciforme*, nas primeiras 24 h de interação. No entanto, contrariamente ao demonstrado por Bautista-Hernández *et al.*, 2019, neste estudo não se observou qualquer influência estatisticamente significativa de *S. aureus* na percentagem de filamentação de *C. parapsilosis*.

#### 4.3.1.2. Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *C. albicans*

##### 4.3.1.2.1. Capacidade de Formação de Biofilme de *C. albicans* em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *C. albicans*

De seguida, e com o objetivo de estudar a interação entre *S. aureus* e *C. albicans* selecionou-se os seguintes meios de cultura: TSA, SDA, TSA+ANB e SDA+GEN. Os resultados obtidos estão representados na Figura 20.



**Figura 20.** Capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus* e *C. albicans* (biofilmes simples e biofilmes duplos) com (BD\_48;24) e sem preformação (BD\_24;24) de biofilmes de 24 h de *S. aureus*. As barras representam os desvios padrões; \* - indica resultados que são significativamente diferentes, ( $p < 0,05$ ).

Realizou-se a comparação dos valores obtidos para BSs e BDs de *S. aureus* para a mesma condição de tempo e verificou-se que, a capacidade de formação de biofilme desta bactéria foi significativamente maior quando em consórcio com *C. albicans* sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). Deste modo, uma possível explicação para este acontecimento pode ter a ver tal como, demonstrado por Al-Fattani & Douglas, 2006 e Harriott & Noverr, 2009 com o facto de haver uma presença de uma grande quantidade de glicose, uma vez que, esta é a principal componente da matriz de *C. albicans*, fornecendo assim, uma fonte de carbono para *S. aureus* e promovendo a formação de biofilme. No entanto, para BDs com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* verificou-se que, a capacidade de formação de biofilme foi significativamente menor à obtida para BSs ( $p < 0,05$ ).

Relativamente, ao comportamento de *C. albicans* em consórcio com *S. aureus*, quando adicionadas simultaneamente, ou seja, sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, os valores obtidos para BSs e BDs não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). No entanto, a capacidade de formação de biofilme de *C. albicans* em BDs com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* foi significativamente menor à obtida para BSs ( $p < 0,05$ ). Assim, uma possível explicação para este

acontecimento poderá ser, tal como mencionado anteriormente, a interferência antagônica da bactéria sobre o fungo. Porém, neste estudo este efeito foi apenas observado quando houve a preformação de um biofilme de 24 h de *S. aureus*.

#### 4.3.1.2.2. Capacidade de Filamentação de *C. albicans* em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *C. albicans*

Foi também avaliada a capacidade de filamentação de *C. albicans* nas diferentes condições testadas e os resultados obtidos foram expressos em percentagem de células com formas filamentosas (Tabela 6). Este estudo foi realizado em células desagregadas de biofilmes monoespécie e biofilmes duplos.

**Tabela 6.** Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes duplos (BDs) de *C. albicans*

	Condição	(Filamentação ± desvio padrão) %
<i>C. albicans</i>	BS_24	33,10 ± 8,33
	BD_24;24	68,04 ± 8,79
	BD_48;24	32,21 ± 4,37

Tal como, mencionado anteriormente *C. albicans* é um dos microrganismos patogênicos fúngicos humanos mais comuns e uma das suas características de virulência mais intensamente estudada é a sua capacidade de transição morfológica reversível de célula de levedura única para filamentos pseudo-hifas e hifas (células alongadas ligadas de ponta a ponta). Assim, os resultados mostraram que, *C. albicans* exibiu formas filamentosas e formas de levedura sendo que, a percentagem de células com formas filamentosas foi menor que 50 % para BSs e BDs com preformação de biofilme de 24 h de *S. aureus*, e superior a 50 % para BDs sem preformação biofilme de 24 h de *S. aureus*, apresentando-se *C. albicans* maioritariamente na forma de levedura.

Para as diferentes condições estudadas existiram diferenças significativas quando comparados os valores obtidos para BSs e BDs sem preformação de biofilme de 24 h de *S. aureus* e verificou-se que, a capacidade de filamentação foi significativamente maior quando associada a um biofilme bacteriano de *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). Desta forma, a presença de formas filamentosas foi influenciada pela presença de *S. aureus*. Tal como mencionado por Ricker *et al.*, 2014, que demonstraram que, a presença de uma bactéria, nomeadamente *Streptococcus gordonii* promoveu a filamentação em *C. albicans*. De forma semelhante, em BDs, Silverman *et al.*, 2010, verificaram que a formação de hifas pode ser mediada por fatores solúveis secretados por estreptococos orais. Porém, não existiram diferenças significativas na

capacidade de filamentação de *C. albicans* quando comparados os valores de BSs e BDs com preformação de biofilme de 24 h de *S. aureus* ( $p > 0,05$ ).

No entanto, quando comparados os valores de BDs com e sem preformação de biofilme bacteriano de 24 h de *S. aureus* existiram diferenças significativas na capacidade de filamentação de *C. albicans*, sendo que a capacidade de filamentação foi significativamente maior quando sem preformação de biofilme de 24 h de *S. aureus*.

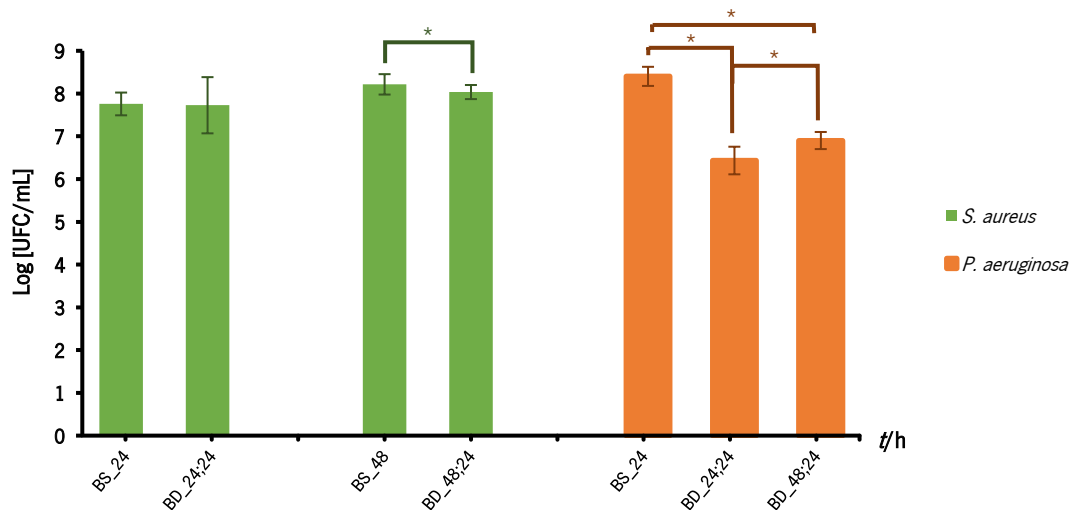
#### 4.3.2. Biofilmes Duplos Bactéria-Bactéria

De seguida, e de forma a estudar biofilmes duplos de bactéria-bactéria, avaliou-se a capacidade de formação de biofilmes de *P. aeruginosa* com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*.

##### 4.3.2.1. Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

###### 4.3.2.1.1. Capacidade de Formação de Biofilme de *P. aeruginosa* em Biofilmes Duplos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Para o estudo do consórcio bacteriano *S. aureus* e *P. aeruginosa*, usaram-se os meios TSA, MSA e Cetrimida Agar, sendo a capacidade de formação de biofilmes avaliada com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* e os resultados obtidos estão representados na **Figura 21**.



**Figura 21.** Capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (biofilmes simples e biofilmes duplos) com (BD\_48;24) e sem preformação (BD\_24;24) de biofilmes de 24 h de *S. aureus*. As barras representam os desvios padrões; \* - indica resultados que são significativamente diferentes, ( $p < 0,05$ ).

No entanto, relativamente à *P. aeruginosa* quando em BDs, com e sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, a capacidade de formação de biofilme foi significativamente menor comparativamente aos BSs ( $p < 0,05$ ). Quanto aos biofilmes de *P. aeruginosa* formados sem

preformação de biofilme de 24 h de *S. aureus*, o valor de logaritmo de UFC/mL foi significativamente menor do que com biofilme preformado de 24 h de *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). Assim, uma possível explicação para este efeito inibitório na capacidade de *P. aeruginosa* formar biofilmes na presença de *S. aureus*, poderá ser, tal como verificado por vários autores, tais como Barequet *et al.*, 2009; Beaume *et al.*, 2015; Biswas *et al.*, 2009; Fugère *et al.*, 2014; Hoffman *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2015; Kvich *et al.*, 2022; Mashburn *et al.*, 2005 e Park *et al.*, 2012, que populações de *S. aureus* na presença de glicose, produzem substâncias que reduzem eficazmente o crescimento de *P. aeruginosa*.

Em relação aos biofilmes de *S. aureus*, foi observado que, quando comparadas as capacidades de formação de biofilmes para BSs e BDs de *S. aureus* para a mesma condição de tempo, verificou-se que, apenas para a condição BDs com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*, a capacidade de formação de biofilme foi significativamente menor estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

## 4.4. Biofilmes Triplos

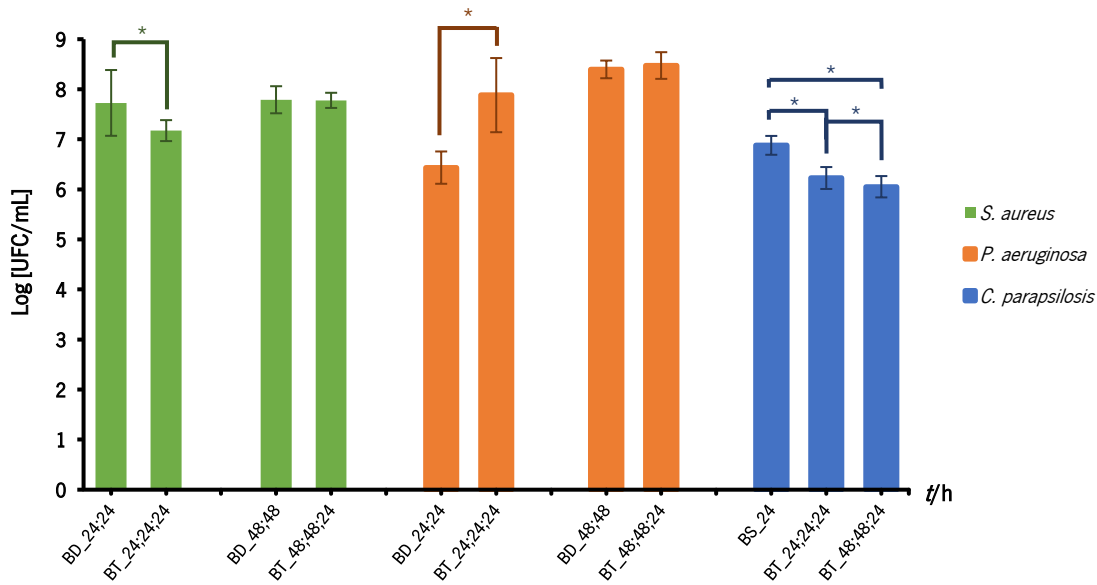
### 4.4.1. Biofilmes Triplos Bactéria-*Candida*

Com o objetivo de estudar como as interações em BTs de bactéria-*Candida* e nomeadamente se a preformação de um biofilme duplo bacteriano pode ou não afetar alguns fatores de virulência da *Candida*, avaliou-se a capacidade de formação de biofilme e filamentação de *Candida* spp com e sem preformação de BDs de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

#### 4.4.1.1. Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis*

##### 4.4.1.1.1. Capacidade de Formação de Biofilme de *C. parapsilosis* em Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis*

Para o estudo de BTs envolvendo *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis* selecionou-se os seguintes meios seletivos: MSA, Cetrimida Agar e SDA+GEN. Os resultados obtidos expressos em logaritmo de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL) estão representados na **Figura 22**.



**Figura 22.** Capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis* (biofilmes simples, duplos e triplos) com (BD\_48;48;24) e sem preformação (BD\_24;24;24) de biofilmes duplos de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As barras representam os desvios padrões; \* - indica resultados que são significativamente diferentes, ( $p < 0,05$ ).

A partir da análise dos resultados, foi possível demonstrar que, a capacidade de formação de BDs de *P. aeruginosa* aumentou gradualmente ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ), indicando assim a capacidade desta bactéria coexistir em consórcio com *S. aureus*. Porém, em BDs de *S. aureus* não se verificou diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo ( $p > 0,05$ ). Procedeu-se ainda, à comparação dos valores obtidos para BDs e BTs de *S. aureus* e *P. aeruginosa* para a mesma condição de tempo e constatou-se que, a capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* foi significativamente menor, na presença de *C. parapsilosis* sem preformação de um BD bacteriano de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* ( $p < 0,05$ ). Tal como mencionado anteriormente no ponto 4.3.1.1.1., que múltiplas interações interespecies ou mesmo a simples produção de um metabolito pode interferir na formação e no desenvolvimento de biofilmes, assim, esta poderá ser uma possível explicação para a diminuição da capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* na presença de *C. parapsilosis*. O mesmo não se verificou para BTs com preformação de BD de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, uma vez que, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à capacidade de formação de BDs e BTs de *S. aureus* ( $p > 0,05$ ).

Relativamente, ao comportamento de *P. aeruginosa*, observou-se que, a capacidade de formação de biofilme foi significativamente maior quando em consórcio com *C. parapsilosis* sem preformação de BD de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* ( $p < 0,05$ ).

Quanto aos biofilmes de *C. parapsilosis* foi possível verificar que, a capacidade de formação de biofilme foi significativamente menor quando em consórcio com BDs de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

( $p < 0,05$ ). No entanto, para BTs com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o valor do logaritmo da UFC/mL foi significativamente menor do que, sem biofilmes preformados de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* ( $p < 0,05$ ). Assim, uma possível explicação para este fenómeno, tal como mencionado por Afonso *et al.*, 2019, é a possível ação antagónica das bactérias sobre o fungo interferindo negativamente no desenvolvimento do biofilme de *C. parapsilosis*.

#### 4.4.1.1.2. Capacidade de Filamentação de *C. parapsilosis* em Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis*

Foi avaliada a capacidade de filamentação de *C. parapsilosis* nas diferentes condições testadas e os resultados obtidos foram expressos em percentagem de células com formas filamentosas (Tabela 7). Este estudo foi realizado em células desagregadas de biofilmes de monoespécie e biofilmes triplos.

**Tabela 7.** Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes triplos (BTs) de *C. parapsilosis*

	Condição	(Filamentação $\pm$ desvio padrão) %
<i>C. parapsilosis</i>	BS_24	35,66 $\pm$ 35,81
	BT_24;24;24	22,73 $\pm$ 16,68
	BT_48;48;24	22,00 $\pm$ 15,05

Mais uma vez se verificou que a *C. parapsilosis* exibiu formas pseudo-filamentosas e formas de levedura sendo que a percentagem de células com formas pseudo-filamentosas foi menor que 50 % em todas as condições estudadas, apresentando-se *C. parapsilosis* predominantemente na forma de levedura.

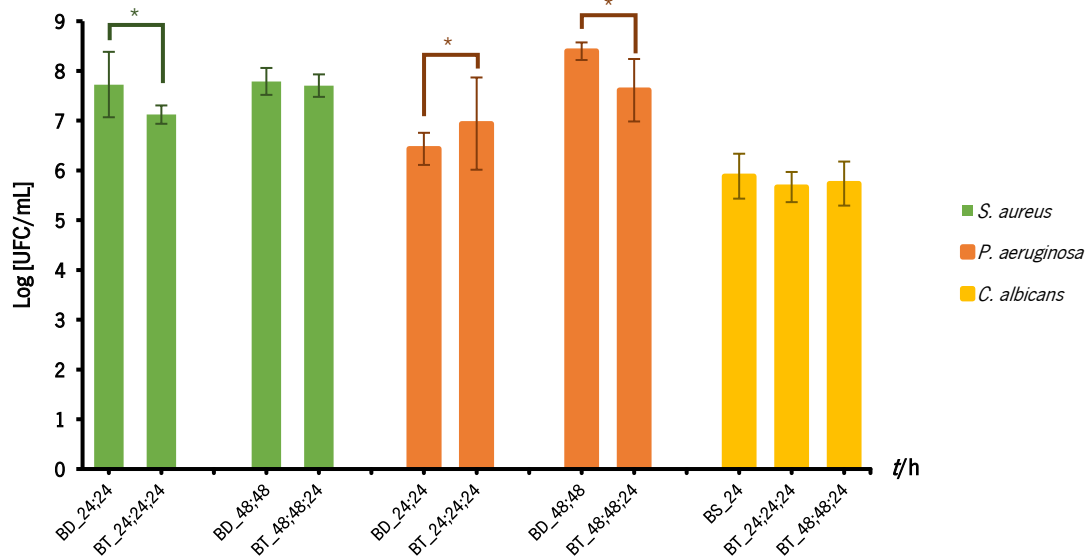
Contrariamente ao citado anteriormente por Bautista-Hernández *et al.*, 2019, para as diferentes condições analisadas não existiram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no que diz respeito ao número de células com formas pseudo-filamentosas, o que poderá sugerir que a presença do consórcio bacteriano em estudo não influenciou a capacidade de filamentação de *C. parapsilosis*.

#### 4.4.1.2. Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

##### 4.4.1.2.1. Capacidade de Formação de Biofilme de *C. albicans* em Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Para o estudo de BTs envolvendo *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* usou-se os seguintes meios seletivos: MSA, Cetrimida Agar e SDA+GEN. Os resultados obtidos estão representados na Figura 23.





**Figura 23.** Capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (biofilmes simples, duplos e triplos) com (BD\_48;48;24) e sem preformação (BD\_24;24;24) de biofilmes duplos de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As barras representam os desvios padrões; \* - indica resultados que são significativamente diferentes, ( $p < 0,05$ ).

Em BDs de *S. aureus* não se verificou diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo ( $p > 0,05$ ). Procedeu-se ainda à comparação dos valores obtidos para BDs e BTs de *S. aureus* e *P. aeruginosa* para a mesma condição de tempo e observou-se que, a capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* foi significativamente menor quando não houve a preformação de um BD bacteriano de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* ( $p < 0,05$ ). Deste modo, foi possível verificar que, tal como mencionado anteriormente no ponto 4.3.1.1.1., que múltiplas interações interespecies ou mesmo a simples produção de um metabolito pode interferir na formação e no desenvolvimento de biofilmes, assim, esta poderá ser uma possível explicação para a diminuição da capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* na presença de *C. albicans*. O mesmo não se verificou para os BTs com preformação de BD de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, uma vez que, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* para BDs e BTs ( $p > 0,05$ ).

Relativamente ao comportamento de *P. aeruginosa*, foi observado que, quando comparadas as capacidades de formação de biofilmes para BDs e BTs de *P. aeruginosa* para a mesma condição de tempo, verificou-se que, para a condição BTs sem preformação de BD de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* observou-se que, a capacidade de formação de biofilme foi significativamente maior estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Porém, em BTs de *P. aeruginosa* com preformação de BD de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* verificou-se que, a capacidade de formação de biofilmes foi significativamente menor estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Em relação, ao comportamento de *C. albicans* os valores obtidos para BSs e BTs com e sem preformação de BD bacteriano de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, estes não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Ao contrário do mencionado anteriormente por Afonso *et al.*, 2019, que as bactérias interferem antagonicamente sobre os fungos, neste estudo este efeito não foi observado em nenhuma das condições estudadas.

#### 4.4.1.2.2. Capacidade de Filamentação de *C. albicans* em Biofilmes Triplos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Foi avaliada a capacidade de filamentação da *C. albicans* com e sem preformação de BD de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e os resultados obtidos foram expressos em percentagem de células com formas filamentosas de biofilmes de monoespécie e biofilmes triplos (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Percentagem de células com formas filamentosas obtidas de biofilmes simples (BSs) e biofilmes triplos (BTs) de *C. albicans*. \* - indica resultados que são significativamente diferentes, ( $p < 0,05$ )

	Condição	(Filamentação $\pm$ desvio padrão) %
<i>C. albicans</i>	BS_24	33,76 $\pm$ 14,28
	BT_24;24;24	69,22 $\pm$ 6,40
	BT_48;48;24	59,43 $\pm$ 17,55

Os resultados mostraram que, *C. albicans* exibiu formas filamentosas e formas de levedura sendo que, a percentagem de células com formas filamentosas foi menor que 50 % para BSs, e superior a 50 % para BTs, apresentando-se a *C. albicans* em BTs maioritariamente na forma filamentosa.

Para as diferentes condições analisadas existiram diferenças significativas quando comparados os valores obtidos para BSs e BTs de *C. albicans* e verificou-se que, a capacidade de filamentação foi significativamente maior quando associada a um BD bacteriano de *S. aureus* e *P. aeruginosa* ( $p < 0,05$ ). Desta forma, a presença de formas filamentosas foi influenciada pela presença de bactérias. Tal como mencionado por Ricker *et al.*, 2014, que demonstraram que *C. albicans* na presença de uma bactéria, nomeadamente *Streptococcus gordonii* promoveu a sua transformação de levedura para hifas. No entanto, não existiram diferenças significativas na capacidade de filamentação de *C. albicans* quando comparados os valores de BTs com e sem preformação de BD bacteriano de 24 h de *S. aureus* e *P. aeruginosa* ( $p > 0,05$ ). Por fim, verificou-se que, a condição BT\_24;24;24 foi a que apresentou maior percentagem de formas filamentosas.

## Capítulo 5. Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro

---

### 5.1. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo o estudo de biofilmes simples (BSs) e polimicrobianos, incluindo biofilmes duplos (BDs) e triplos (BTs), envolvendo bactérias e fungos nomeadamente da espécie *Candida*. Para isso, foram estudadas as interações bactéria-bactéria e bactéria-*Candida* com e sem preformação de biofilmes bacterianos e estudou-se como estas interações afetam alguns fatores de virulência das espécies envolvidas nomeadamente a capacidade de formação de biofilmes e no caso das *Candida*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, a capacidade de filamentação.

Relativamente à capacidade de formação de BSs de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* concluiu-se que, de uma forma geral, todos os microrganismos demonstraram uma boa formação de biofilmes ao fim de 24 h de incubação.

Para o estudo de biofilmes polimicrobianos procedeu-se à otimização dos meios seletivos tendo-se conseguido selecionar meios seletivos para todos os consórcios microbianos estudados.

Quanto aos biofilmes duplos (BDs) observou-se ação antagónica na formação de biofilmes de ambas as espécies de *Candida* quando em consórcio com *S. aureus* sendo esta ação mais evidente com preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*.

Quanto à capacidade de formação de biofilmes de *S. aureus* em consórcio com *Candida*, esta diferiu dependendo da espécie de *Candida* (*C. albicans* ou *C. parapsilosis*) presente no consórcio duplo. *C. albicans* promoveu a formação de biofilme de *S. aureus* e a *C. parapsilosis* mostrou um efeito antagónico.

Nos BDs bacterianos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, a capacidade de formação de biofilmes de *P. aeruginosa* foi menor comparativamente a um BS sendo esta diminuição da capacidade de formação de biofilme mais significativa nos BDs sem preformação de biofilmes de 24 h de *S. aureus*.

Nos BTs envolvendo *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. parapsilosis* verificou-se que os biofilmes bacterianos preformados (*S. aureus*+*P. aeruginosa*) expressaram uma maior influência antagónica sobre a capacidade de formação de biofilmes de *C. parapsilosis* comparativamente a BTs sem preformação de biofilmes bacterianos. O mesmo não se verificou em BTs envolvendo *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* uma vez que, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à capacidade de formação de biofilme de *C. albicans*.

Relativamente à capacidade de filamentação, a ausência ou presença de preformação de biofilmes bacterianos, parece não ter influência neste fator de virulência das *Candida*, à exceção de BTs com *C. albicans* em que a presença de bactérias parece estimular a filamentação.

Por último, é importante ressaltar a importância que este estudo revela na área do conhecimento dos biofilmes polimicrobianos associados a UPs, uma vez que, a informação é escassa e poucos estudos existem sobre como os microrganismos interagem e quais são as consequências obtidas por parte dessas interações.

## 5.2. Propostas de Trabalho Futuro

O trabalho desenvolvido no âmbito desta investigação permitiu antever a necessidade de aprofundar o estudo em vários pontos. Em função da análise dos resultados alcançados, sugere-se numa próxima oportunidade de investigação o estudo de outros fatores de virulência da *Candida*, como proteases e fosfolipases. Assim como, aumentar a diversidade de interações entre fungos e bactérias, uma vez que os fungos podem oferecer suporte biótico para o estabelecimento de um biofilme bacteriano. Numa segunda etapa, deverão ser avaliados alguns tratamentos terapêuticos direcionados para bactérias, como por exemplo antibióticos, de modo a determinar como afetam alguns fatores de virulência de espécies de *Candida*. Por fim, realizar-se ainda ensaios em modelos de feridas de forma a simular o ambiente das UPs.

## Referências

---

- A. Z. Kaya, N. Turani, & M. Akyüz. (2005). The effectiveness of a hydrogel dressing compared with standard management of pressure ulcers. In *Am J Phys Med and Rehabil* (Vol. 74).
- Afonso, T. B., Simões, L. C., & Lima, N. (2019). In vitro assessment of inter-kingdom biofilm formation by bacteria and filamentous fungi isolated from a drinking water distribution system. *Biofouling*, 35(10), 1041–1054. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1688793>
- Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 55(8), 999–1008. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0>
- Anders, J., Heinemann, A., Leffmann, C., Leutenegger, M., Profener, F., & von Renteln-Kruse, W. (2010). Decubitus Ulcers: Pathophysiology and Primary Prevention. *Deutsches Arzteblatt*, 107(21), 371–382. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0371>
- Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Usmani, S., Al-Waili, N. S., Sharma, D., Nuru, A., & Al-Attal, Y. (2013). Effect of jujube honey on *Candida Albicans* growth and biofilm formation. *Archives of Medical Research*, 44(5), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.06.003>
- Barbier, M., Damron, F. H., Bielecki, P., Suárez-Diez, M., Puchałka, J., Albertí, S., Dos Santos, V. M., & Goldberg, J. B. (2014). From the environment to the host: Re-wiring of the transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22°C to 37°C. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089941>
- Barequet, I. S., Habot-Wilner, Z., Mann, O., Safrin, M., Ohman, D. E., Kessler, E., & Rosner, M. (2009). Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* staphylolysin (LasA protease) in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endophthalmitis in a rat model. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 247(7), 913–917. <https://doi.org/10.1007/s00417-009-1061-2>
- Barnett, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8: Taxonomy. In *Yeast* (Vol. 21, Issue 14, pp. 1141–1193). <https://doi.org/10.1002/yea.1154>
- Bates-Jensen, B. M., McCreath, H. E., & Pongquan, V. (2009). Subepidermal moisture is associated with early pressure ulcer damage in nursing home residents with dark skin tones: Pilot findings. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, 36(3), 277–284. <https://doi.org/10.1097/WON.0b013e3181a19e53>
- Bautista-Hernández, L. A., Gómez-Olivares, J. L., Buentello-Volante, B., Dominguez-Lopez, A., Garfias, Y., Acosta-García, M. C., Calvillo-Medina, R. P., & Bautista-de Lucio, V. M. (2019). Negative interaction of *Staphylococcus aureus* on *Fusarium falciforme* growth ocular isolates in an in vitro mixed biofilm. *Microbial Pathogenesis*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103644>
- Beaume, M., Köhler, T., Fontana, T., Tognon, M., Renzoni, A., & van Delden, C. (2015). Metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* involved in competition with respiratory bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00321>

- Bhattacharya, S., & Mishra, R. (2015). Pressure ulcers: Current understanding and newer modalities of treatment. In *Indian Journal of Plastic Surgery* (Vol. 48, Issue 1, pp. 4–16). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.155260>
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2011). Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/601905>
- Biswas, L., Biswas, R., Schlag, M., Bertram, R., & Götz, F. (2009). Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6910–6912. <https://doi.org/10.1128/AEM.01211-09>
- Black, J., Baharestani, M. M., Cuddigan, J., Dorner, B., Edsberg, L., Langemo, D., Posthauer, M. E., Ratliff, C., & Taler, G. (1997). National Pressure Ulcer Advisory Panel's Updated Pressure Ulcer Staging System. *Adv Wound Care*, 10, 8–107.
- Bowler, P. G., Duerden, B. I., & Armstrong, D. G. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 2, pp. 244–269). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 47, pp. 86–98). Elsevier Editora Ltda. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
- Bredesen, I. M., Bjørø, K., Gunningberg, L., & Hofoss, D. (2015). The prevalence, prevention and multilevel variance of pressure ulcers in Norwegian hospitals: A cross-sectional study. *International Journal of Nursing Studies*, 52(1), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2014.07.005>
- Brito, L. R., Guimarães, T., Nucci, M., Rosas, R. C., Paula Almeida, L., Da Matta, D. A., & Colombo, A. L. (2006). Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology*, 44(3), 261–266. <https://doi.org/10.1080/13693780500421476>
- Buchheid, D., Skladny, H., Baust, C., & Hehlmann, R. (2000). Clinical Report Systemic Infections with *Candida* sp. and *Aspergillus* sp. in Immunocompromised Patients with Hematological Malignancies: Current Serological and Molecular Diagnostic Methods. In *Chemotherapy* (Vol. 46). [www.karger.com/journals/che](http://www.karger.com/journals/che)
- Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Moser, C., Kirketerp-Møller, K., Johansen, H. K., Høiby, N., Jensen, P. Ø., Sørensen, S. J., & Bjarnsholt, T. (2010). Biofilms in chronic infections - A matter of opportunity - Monospecies biofilms in multispecies infections. In *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (Vol. 59, Issue 3, pp. 324–336). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x>
- Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M., Viudes, A., & Espinel-Ingroff, A. (2004). Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2477–2482. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2477-2482.2004>
- Cardona, A. F., & Wilson, S. E. (2015). Skin and Soft-Tissue Infections: A Critical Review and the Role of Telavancin in Their Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 61, S69–S78. <https://doi.org/10.1093/cid/civ528>

- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 5, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Cereda, E., Klersy, C., Seriola, M., Crespi, A., D'Andrea, F., D'Andrea, F., Micunco, C., Seriola, M., Caccialanza, R., Bonardi, C., Crespi, A., Lombardi, A., Andreola, E., Gavassa, L., De Donà, F., Martinoglio, P., Gervasio, S., Penoncelli, D., Demagistris, A., ... Cozza, M. (2015). A nutritional formula enriched with arginine, zinc, and antioxidants for the healing of pressure ulcers: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, *162*(3), 167–174. <https://doi.org/10.7326/M14-0696>
- Cervantes-Huamán, B. R. H., Ripolles-Avila, C., Mazaheri, T., & Rodriguez-Jerez, J. J. (2022). Pathogenic mono-species biofilm formation on stainless steel surfaces: Quantitative, qualitative, and compositional study. *LWT*, *159*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113211>
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, *183*(18), 5385–5394. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition*. [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
- Coleman, S., Gorecki, C., Nelson, E. A., Closs, S. J., Defloor, T., Halfens, R., Farrin, A., Brown, J., Schoonhoven, L., & Nixon, J. (2013). Patient risk factors for pressure ulcer development: Systematic review. In *International Journal of Nursing Studies* (Vol. 50, Issue 7, pp. 974–1003). <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2012.11.019>
- Colombo, A. L., Nucci, M., Park, B. J., Nouér, S. A., Arthington-Skaggs, B., Da Matta, D. A., Warnock, D., & Morgan, J. (2006). Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(8), 2816–2823. <https://doi.org/10.1128/JCM.00773-06>
- Conlon, B. P., Rowe, S. E., & Lewis, K. (2015). Persister cells in biofilm associated infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *831*, 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4_1)
- Costa-De-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonça, D., & Gonçalves Rodrigues, A. (2008). A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *27*(5), 365–374. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0448-4>
- Cutting, K. F., & Ed, C. (2006). Rincón científico COMUNICACIONES Revisión de criterios para la identificación de infecciones en heridas. In *GEROKOMOS* (Vol. 17, Issue 1).
- Day, K. (2009). *PRESSURE ULCER PREVENTION prevalence and incidence in context a consensus document*. [www.rnao.org](http://www.rnao.org)
- Dealey, C., Brindle, C. T., Black, J., Alves, P., Santamaria, N., Call, E., & Clark, M. (2015). Challenges in pressure ulcer prevention. *International Wound Journal*, *12*(3), 309–312. <https://doi.org/10.1111/iwj.12107>

- Dealey, C., Chambers, T., Beldon, P., Benbow, M., Fletcher, J., Fumarola, S., Guy, H., Nixon, J., Price, J., Purser, K., Stubbs, N., Way, L., & Weafer, K. (2012). Achieving consensus in pressure ulcer reporting. *Journal of Tissue Viability*, *21*(3), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2012.05.001>
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (United Kingdom)*, *166*(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
- Doggett, M. S. (2000). Characterization of Fungal Biofilms within a Municipal Water Distribution System. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 66, Issue 3). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. In *Emerging Infectious Diseases* • (Vol. 8, Issue 9). <http://www.microbelibrary.org/>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 2, pp. 167–193). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Dowd, S. E., Hanson, J. D., Rees, E., Wolcott, R. D., Zischau, A. M., Sun, Y., White, J., Smith, D. M., Kennedy, J., & Jones, C. E. (2011). Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *Journal of Wound Care*, *20*(1), 40–47.
- Edsberg, L. E., Black, J. M., Goldberg, M., McNichol, L., Moore, L., & Sieggreen, M. (2016). Revised National Pressure Ulcer Advisory Panel Pressure Injury Staging System. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, *43*(6), 585–597. <https://doi.org/10.1097/WON.0000000000000281>
- Edwards, M. (1994). The rationale for the use of risk calculators in pressure sore prevention, and the evidence of the reliability and validity of published scales. *Journal of Advanced Nursing*, *20*, 288–296.
- El-Azizi, M., Farag, N., & Khardori, N. (2015). Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0083-3>
- Escola Superior de Biotecnologia, U. C. (2023). *Staphylococcus aureus*. ASAE. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>
- Espejo, E., Andrés, M., Borrallo, R. M., Padilla, E., Garcia-Restoy, E., & Bella, F. (2018). Bacteremia associated with pressure ulcers: a prospective cohort study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *37*(5), 969–975. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3216-8>
- Espinosa, A., Palencia, S. L., García, A., & Palencia, M. (2020). Polymicrobial Biofilms: Fundamentals, diseases, and treatments - A review. *Journal of Science with Technological Applications*, *8*, 4–54. <https://doi.org/10.34294/j.jsta.20.8.54>
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *IJAMBR*, *4*, 90–101.
- Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H. C., Schäfer, W., & Hube, B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of



- the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infection and Immunity*, 70(7), 3689–3700. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3689-3700.2002>
- Fetsch, A., & Johler, S. (2018). Staphylococcus aureus as a Foodborne Pathogen. In *Current Clinical Microbiology Reports* (Vol. 5, Issue 2, pp. 88–96). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0094-x>
- Filler, S. G., Kullberg, B. J., & Calderone, R. A. (2002). *Candida and Candidiasis* (Richard A. Calderone & Cornelius J. Clancy, Eds.; 2nd ed.). <https://books.google.pt/books?id=9u6rBAAAQBAJ&pg=PT9&ots=g-LdFKrdOM&lr&hl=pt-PT&pg=PT6#v=onepage&q&f=false>
- Franklin D. Lowy, M. D. (1998). Staphylococcus Aureus Infections. *The New England Journal of Medicine*, 339, 520–532.
- Fridkin, S. K., Kaufman, D., Edwards, J. R., Shetty, S., & Horan, T. (2006). Changing incidence of Candida bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics*, 117(5), 1680–1687. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1996>
- Friedman, N. D., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 22, Issue 5, pp. 416–422). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>
- Fugère, A., Séguin, D. L., Mitchell, G., Déziel, E., Dekimpe, V., Cantin, A. M., Frost, E., & Malouin, F. (2014). Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus from adult cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086705>
- García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M., & D'Enfert, C. (2004). Candida albicans biofilms: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 536–545. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.536-545.2004>
- Garibaldi, R. A. ;, Brodine, S., & Matsumiya, S. (1981). Infections Among Patients in Nursing Homes. *New England Journal of Medicine*, 305(13), 731–735.
- Gomes, F., Furtado, G. E., Henriques, M., Sousa, L. B., Santos-Costa, P., Bernardes, R., Apóstolo, J., Parreira, P., & Salgueiro-Oliveira, A. (2022). The skin microbiome of infected pressure ulcers: A review and implications for health professionals. In *European Journal of Clinical Investigation* (Vol. 52, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/eci.13688>
- Gonçalves, A. B., Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2006). Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209(3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.12.001>
- Ganel-Brocard, F. (2011). *Prevalence Analysis of Fungi in Chronic Lower Extremity Ulcers*. <https://www.researchgate.net/publication/228505170>
- Grant, S. S., & Hung, D. T. (2013). Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. In *Virulence* (Vol. 4, Issue 4, pp. 273–283). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.23987>
- Grice, E. A., Professor, A., & Cutan Med Surg Author manuscript, S. (2014). The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease HHS Public Access Author manuscript. In *Biomedical Research Building* (Vol. 33, Issue 2).

- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(9), 3914–3922. <https://doi.org/10.1128/AAC.00657-09>
- Hoffman, L. R., Dé Ziel, E., D'argenio, D. A., Emerson, J., Mcnamara, S., Gibson, R. L., Ramsey, B. W., & Miller, S. I. (2006). *Selection for Staphylococcus aureus small-colony variants due to growth in the presence of Pseudomonas aeruginosa*. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
- Hopkins, A. (2012). Achieving consensus in pressure ulcer reporting. In *Journal of Tissue Viability* (Vol. 21, Issue 3, p. 71). <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2012.06.001>
- James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. D., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., & Stewart, P. S. (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, *16*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
- J.D. Shea. (1975). Pressure sores: classification and management. *Clin Orthop Relat Res*, *112*(1), 89–100.
- Kadkhoda, H., Ghalavand, Z., Nikmanesh, B., Kodori, M., Hour, H., Maleki, D. T., Bavandpour, A. K., & Eslami, G. (2020). Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *23*(5), 691–698. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.36299.8644>
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 73, Issue 4, pp. 338–344). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>
- Kim, S., Yoon, Y., & Choi, K. H. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* DesB promotes *staphylococcus aureus* growth inhibition in coculture by controlling the synthesis of HAQs. *PLoS ONE*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134624>
- Kives, J., Guadarrama, D., Orgaz, B., Rivera-Sen, A., Vazquez, J., & SanJose, C. (2005). Interactions in Biofilms of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* cultured in cold UHT milk. *Journal of Dairy Science*, *88*(12), 4165–4171. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73102-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73102-7)
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 423–435). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Kon, K., & Rai, M. (2016). Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. In *Antibiotic Resistance*.
- Kottner, J., Dassen, T., Balzer, K., & Heinze, S. (2009). Pressure ulcers: A critical review of definitions and classifications. *OSTOMY WOUND MANAGEMENT*. <https://www.researchgate.net/publication/26864172>
- Kousser, C., Clark, C., Sherrington, S., Voelz, K., & Hall, R. A. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *Rhizopus microsporus* germination through sequestration of free environmental iron. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42175-0>
- Krčméry, V. ; Frič, M. ; Písarčíková, M. ; Huttová, M. ; Filka, J. ; Kralinsky, K. ; Hupková, H. ; Hanzen, J. ; Trupl, J. ; & Lišková, M. (2000). *Fungemia in Neonates: Report of 80 Cases From Seven University Hospitals*. <http://pediatrics.aappublications.org/>

- Kvich, L., Crone, S., Christensen, M. H., Lima, R., Alhede, M., Alhede, M., Staerk, D., & Bjarnsholt, T. (2022). Investigation of the Mechanism and Chemistry Underlying *Staphylococcus aureus*' Ability to Inhibit *Pseudomonas aeruginosa* Growth In Vitro. *Journal of Bacteriology*, *204*(11). <https://doi.org/10.1128/jb.00174-22>
- Laffey, S. F., & Butler, G. (2005). Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, *151*(4), 1073–1081. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27739-0>
- Langsrud, S., Sundheim, G., & Borgmann-Strahsen, R. (2003). Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(4), 874–882. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02064.x>
- Lemanceau, P., A. H. M. Bakker, P., Jan de Kogel, W., Alabouvetite, C., & Schippers, B. (1993). Antagonistic Effect of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon Pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(1), 74–82. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Levine, S. M., Sinno, S., Levine, J. P., & Saadeh, P. B. (2013). Current thoughts for the prevention and treatment of pressure ulcers: Using the evidence to determine fact or fiction. In *Annals of Surgery* (Vol. 257, Issue 4, pp. 603–608). <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318285516a>
- Lindsay, D., & von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 64, Issue 4, pp. 313–325). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>
- Livesley, N. J., & Chow, A. W. (2002). Infected pressure ulcers in elderly individuals. *Clinical Infectious Diseases*, *35*(11), 1390–1396. <https://doi.org/10.1086/344059>
- Lyder, C. H., & Ayello, E. A. (2008). Chapter 12. Pressure Ulcers: A Patient Safety Issue. In *Patient Safety and Quality: An Evidence-Based Handbook for Nurses* (Vol. 1). <http://www.bradenscale.com.braden.pdf>.
- Lynch, D. P., & Memphis, T. (1994). Oral candidiasis History, classification, and clinical presentation. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 189–193.
- Maklebust, J. (1997). Pressure ulcer assessment. *Clinics in Geriatric Medicine*, *13*, 455–481.
- Mashburn, L. M., Jett, A. M., Akins, D. R., & Whiteley, M. (2005). *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *Journal of Bacteriology*, *187*(2), 554–566. <https://doi.org/10.1128/JB.187.2.554-566.2005>
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 39–50). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- MEDRANO, D. J. A., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R. de A., ROCHA, M. F. G., RABENHORST, S. H. B., & SIDRIM, J. J. C. (2006). Candidemia in a Brazilian Hospital: the Importance of *Candida parapsilosis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, *48*(1), 17–20.
- Messer, S. A., Jones, R. N., & Fritsche, T. R. (2006). International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(5), 1782–1787. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1782-1787.2006>

- Moore, Z., Cowman, S., & Conroy, R. M. (2011). A randomised controlled clinical trial of repositioning, using the 30° tilt, for the prevention of pressure ulcers. *Journal of Clinical Nursing*, *20*(17–18), 2633–2644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2011.03736.x>
- Moore, Z., Van Etten, M., Strapp, H., Solbakken, T., Eskerud Smith, B., & Faulstich, J. (2015). Pressure ulcer prevalence and prevention practices: a cross-sectional comparative survey in Norway and Ireland. *Journal of Wound Care*, *24*(8).
- Mouës, C. M., Heule, F., & Hovius, S. E. R. (2011). A review of topical negative pressure therapy in wound healing: Sufficient evidence? In *American Journal of Surgery* (Vol. 201, Issue 4, pp. 544–556). <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2010.04.029>
- Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S., & Ramage, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 313, Issue 2, pp. 96–102). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02130.x>
- Nakamura, T., & Takahashi, H. (2006). Epidemiological study of *Candida* infections in blood: Susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *12*(3), 132–138. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0438-y>
- National Pressure Ulcer Advisory Panel, & European Pressure Ulcer Advisory Panel. (2009). *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Clinical Practice Guideline*. European Pressure Ulcer Advisory Panel. [www.nzwcs.org.nz](http://www.nzwcs.org.nz)
- Németh, T., Tóth, A., Szenzenstein, J., Horváth, P., Nosanchuk, J. D., Grózer, Z., Tóth, R., Papp, C., Hamari, Z., Vágvolgyi, C., & Gácsér, A. (2013). Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* Sensu Lato Species. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068704>
- Ng, K. P., Saw, T. L., Na, S. L., & Soo-Hoo, T. S. (2000). Systemic *Candida* infection in University Hospital. In *Mycopathologia* (Vol. 149).
- Nicholas M Moore, & Maribeth L Flaws. (2011). Introduction: *Pseudomonas aeruginosa*. In *Clinical Laboratory Science* (Vol. 24, pp. 41–42). <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- Nikaein, D., Sharifzadeh, A., & Khosravi, A. R. (2018). Fungicidal versus Fungistatic activity of five Iranian essences against fluconazole resistant *Candida* species. *Journal of HerbMed Pharmacology*, *7*(4), 287–293. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.43>
- Nogueira, M. F., Pereira, L., Jenull, S., Kuchler, K., & Lion, T. (2019). *Klebsiella pneumoniae* prevents spore germination and hyphal development of *Aspergillus* species. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36524-8>
- Nursing, R. C., Health, N. I., & Excellence, C. (2005). The management of pressure ulcers in primary and secondary care: A Clinical Practice Guideline. In *Pressure ulcers in primary and secondary care*. <http://www.dh.gov.uk/PolicyAndGuidance/HealthAndSocialCareTopics/ChildrenServic>
- Ohura, T., Nakajo, T., Okada, S., Omura, K., & Adachi, K. (2011). Evaluation of effects of nutrition intervention on healing of pressure ulcers and nutritional states (randomized controlled trial). *Wound Repair and Regeneration*, *19*(3), 330–336. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00691.x>

- Oliveira, M., Nunes, S. F., Carneiro, C., Bexiga, R., Bernardo, F., & Vilela, C. L. (2007). Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*, *124*(1–2), 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.016>
- O'toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.*, *54*, 49–79. [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Pancorbo-Hidalgo, P. L., García-Fernández, F. P., Torra Bou, J.-E., Verdú Soriano, J., & Javier Soldevilla-Agreda, J. (2014). Pressure ulcers epidemiology in Spain in 2013: results from the 4th National Prevalence Survey. In *ORIGINALES* (Vol. 162, Issue 4).
- Park, J. H., Lee, J. H., Cho, M. H., Herzberg, M., & Lee, J. (2012). Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. *FEMS Microbiology Letters*, *335*(1), 31–38. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02635.x>
- Parsaeimehr, A., & Lutz, G. A. (2016). Algae as a Novel Source of Antimicrobial Compounds: Current and Future Perspectives. Current and Future Perspectives. In *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches* (pp. 377–396). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00018-6>
- Percival, S. L., McCarty, S. M., & Lipsky, B. (2015). Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Advances in Wound Care*, *4*(7), 373–381. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0557>
- Peter Lowthian, MPhil, & SRN. (2007). The Distinction Between Superficial Pressure Ulcers and Moisture Lesions. *Skinmed*, *6*(3), 111–112.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Jones, R. N., Sader, H. S., Fluit, A. C., Hollis, R. J., & Messer, S. A. (2001). International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(9), 3254–3259. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3254-3259.2001>
- Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Hollis, R. J., & Messer, S. A. (1998). International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 36, Issue 7). <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- Pires, R. H., Santos, J. M. dos, Zaia, J. E., Martins, C. H. G., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2011). *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *106*(6), 646–654.
- Por, T., Carlos, J., & Alves, F. (2015). *Mestrado em Feridas e Viabilidade Tecidual Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Feridas e Viabilidade PREVALÊNCIA DE FERIDAS NUM HOSPITAL CENTRAL DO DISTRITO DE BRAGA.*
- Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Schuldiner, S., Sotto, A., & Lavigne, J. P. (2020). Biofilms in diabetic foot ulcers: Significance and clinical relevance. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 10, pp. 1–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101580>
- Priest, S. J., & Lorenz, M. C. (2015). Characterization of virulence-related phenotypes in *Candida* species of the CUG clade. *Eukaryotic Cell*, *14*(9), 931–940. <https://doi.org/10.1128/EC.00062-15>

- Priya, A., & Pandian, S. K. (2020). Piperine Impedes Biofilm Formation and Hyphal Morphogenesis of *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00756>
- Rahim, K., Saleha, S., Zhu, X., Huo, L., Basit, A., & Franco, O. L. (2017). Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. In *Microbial Ecology* (Vol. 73, Issue 3, pp. 710–721). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0867-9>
- R.D. Wolcott, J.P. Kenned, & S.E. Dowd. (2009). Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic. *JOURNAL OF WOUND CARE*, *18*.
- Rich, S. E., Margolis, D., Shardell, M., Hawkes, W. G., Miller, R. R., Amr, S., & Baumgarten, M. (2011). Frequent manual repositioning and incidence of pressure ulcers among bed-bound elderly hip fracture patients. *Wound Repair and Regeneration*, *19*(1), 10–18. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00644.x>
- Ricker, A., Vickerman, M., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2014). *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase promotes biofilm interactions with *Candida albicans*. *Journal of Oral Microbiology*, *6*(1). <https://doi.org/10.3402/jom.v6.23419>
- Rosenbach, Friedr. Jul. (1884). *Mikro-Organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen* (J. F. Bergmann. Wiesbaden, Ed.).
- Rotstein, O. D., Vittorini, T., Kao, J., Mcburney, M. I., Nasmith, P. E., & Grinstein, S. (1989). A Soluble Bacteroides By-Product Impairs Phagocytic Killing of *Escherichia coli* by Neutrophils. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 57, Issue 3). <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Sardo, P. M. G., Simões, C. S. O., Alvarelhão, J. J. M., De Oliveira Costa, C. T., Simões, C. J. C., Figueira, J. M. R., Simões, J. F. F. L., Amado, F. M. L., Amaro, A. J. M., & Melo, E. M. O. P. (2016). Analyses of pressure ulcer point prevalence at the first skin assessment in a Portuguese hospital. *Journal of Tissue Viability*, *25*(2), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.02.006>
- Sardo, P., Simões, C., Alvarelhão, J., Costa, C., Simões, C. J., Figueira, J., Simões, J. L., Amado, F., Amaro, A., & Melo, E. (2015). Pressure ulcer risk assessment: Retrospective analysis of Braden Scale scores in Portuguese hospitalised adult patients. *Journal of Clinical Nursing*, *24*(21–22), 3165–3176. <https://doi.org/10.1111/jocn.12927>
- Sarheed, O., Ahmed, A., Shouqair, D., & Boateng, J. (2016). Antimicrobial Dressings for Improving Wound Healing. In *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63961>
- Scheckler, W. E., & Peterson, P. J. (1986). Infections and Infection Control Among Residents of Eight Rural Wisconsin Nursing Homes. *Archives of Internal Medicine*, *146*, 1981–1984. <http://archinte.jamanetwork.com/>
- Scheel-Sailer, A., Wyss, A., Boldt, C., Post, M. W., & Lay, V. (2013). Prevalence, location, grade of pressure ulcers and association with specific patient characteristics in adult spinal cord injury patients during the hospital stay: A prospective cohort study. *Spinal Cord*, *51*(11), 828–833. <https://doi.org/10.1038/sc.2013.91>
- Sejvar, J. J. (2013). Neuroinfections (What Do I Do Now?). *Emerging Infectious Diseases*, *19*(9), 1553–1553. <https://doi.org/10.3201/eid1909.130975>
- Seneviratne, G., Zavahir, J. S., Bandara, W. M. M. S., & Weerasekara, M. L. M. A. W. (2008). Fungal-bacterial biofilms: Their development for novel biotechnological applications. In *World Journal of*

*Microbiology and Biotechnology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 739–743).  
<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9539-8>

- Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U. F., Caroleo, B., Amato, B., Gallelli, L., & De Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: The role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *13*(5), 605–613. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1023291>
- Silva, A. J., Pereira, S. M., Rodrigues, A., Rocha, A. P., Varela, J., Gomes, L. M., Messias, N., Carvalho, R., Luis, R., & Mendes, L. F. P. (2013). Economic cost of treating pressure ulcers: A theoretical approach. *Revista Da Escola de Enfermagem*, *47*(4), 967–972. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420130000400028>
- Silverman, R. J., Nobbs, A. H., Vickerman, M. M., Barbour, M. E., & Jenkinson, H. F. (2010). Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 Protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities. *Infection and Immunity*, *78*(11), 4644–4652. <https://doi.org/10.1128/IAI.00685-10>
- Smith, F., Dryburgh, N., Donaldson, J., & Mitchell, M. (2013). Debridement for surgical wounds. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2013, Issue 9). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006214.pub4>
- Smith, P. W., Black, J. M., & Black, S. B. (1999). Infected Pressure Ulcers in the Long-Term-Care Facility. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *20*(05), 358–361. <https://doi.org/10.1086/501636>
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, *28*(1), 12–55. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x>
- Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2017). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. In *European Surgical Research* (Vol. 58, Issues 1–2, pp. 81–94). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000454919>
- Steven Peck. (2023). *Over 60,000 People Die Each Year From the Complications of Bed Sores, Pressure Sores and Decubitus Ulcers*. PECK LAW GROUP. <https://premierlegal.org/over-60000-people-die-each-year-from-the-complications-of-bed-sores-pressure-sores-and-decubitus-ulcers/>
- Suddarth's, & Brunner. (2010). *Textbook of Medical-surgical Nursing* (LWW, Ed.; 12th ed.).
- T. V. Taylor, S. Rimmer, B. Day, J. Butcher, & I. W. Dymock. (1974). Ascorbic Acid Supplementation in the Treatment of Pressure-Sores. In *Am. J. Dis. Child* (Vol. 9, Issue 10).
- Taradaj, J. (2017a). Prevention and treatment of pressure ulcers by newest recommendations from european pressure ulcer advisory panel (EPUAP): Practical reference guide for GPs. *Family Medicine and Primary Care Review*, *19*(1), 81–83. <https://doi.org/10.5114/fmpcr.2017.65097>
- Taradaj, J. (2017b). Prevention and treatment of pressure ulcers by newest recommendations from european pressure ulcer advisory panel (EPUAP): Practical reference guide for GPs. *Family Medicine and Primary Care Review*, *19*(1), 81–83. <https://doi.org/10.5114/fmpcr.2017.65097>
- Toc, D. A., Csapai, A., Popa, F., Popa, C., Pascalau, V., Tosa, N., Botan, A., Mihaila, R. M., Costache, C. A., Colosi, I. A., & Junie, L. M. (2022). Easy and Affordable: A New Method for the Studying of Bacterial Biofilm Formation. *Cells*, *11*(24). <https://doi.org/10.3390/cells11244119>

- Trofa, D., Gácsér, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 21, Issue 4, pp. 606–625). <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. In *Pathogens and disease* (Vol. 74, Issue 4, p. ftw018). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Úlceras por Pressão nos idosos*. (2021). Warmy Lda. <https://www.warmy.pt/wp/ulceras-por-pressao-nos-idosos/>
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., & Ghigo, J.-M. (2006). Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *PNAS*, *103*(33). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605399103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605399103)
- Van Koppen, C. J., & Hartmann, R. W. (2015). Advances in the treatment of chronic wounds: A patent review. In *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (Vol. 25, Issue 8, pp. 931–937). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1045879>
- Van Rensburg, J. J., Lin, H., Gao, X., Toh, E., Fortney, K. R., Ellinger, S., Zwickl, B., Janowicz, D. M., Katz, B. P., Nelson, D. E., Dong, Q., & Spinolaa, S. M. (2015). The human skin microbiome associates with the outcome of and is influenced by bacterial infection. *MBio*, *6*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01315-15>
- Vanderwee, K., Clark, M., Dealey, C., Gunningberg, L., & Defloor, T. (2007). Pressure ulcer prevalence in Europe: A pilot study. *Journal of Evaluation in Clinical Practice*, *13*(2), 227–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2753.2006.00684.x>
- Voegeli, D. (2011). Pressure ulcer or moisture lesion—what's the difference? *Nursing and Residential Care*, *13*(5), 222–227. <https://doi.org/10.12968/nrec.2011.13.5.222>
- Weems, J. J. (1992). *Candida parapsilosis: Epidemiology, Pathogenicity, Clinical Manifestations, and Antimicrobial Susceptibility*. <http://cid.oxfordjournals.org/>
- Wolcott, R. D., Hanson, J. D., Rees, E. J., Koenig, L. D., Phillips, C. D., Wolcott, R. A., Cox, S. B., & White, J. S. (2016). Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair and Regeneration*, *24*(1), 163–174. <https://doi.org/10.1111/wrr.12370>
- Wound Care*. (2022). Medtech Services Inc. <https://www.medtech-services.com/wound-care>
- Xu, H., Sobue, T., Thompson, A., Xie, Z., Poon, K., Ricker, A., Cervantes, J., Diaz, P. I., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2014). Streptococcal co-infection augments candida pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cellular Microbiology*, *16*(2), 214–231. <https://doi.org/10.1111/cmi.12216>
- Yarkony, G. M., Matthews Kirk, P., Carlson, C., Roth, E. J., Lovell, L., Heinemann, A., King, R., Lee, M. Y., Betts, H. B., Yarkony, C., & Kirk, M. (1989). Classification of Pressure Ulcers From the Rehabilitation Institute of. In *American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation* (Issue 8). <http://archderm.jamanetwork.com/>
- Yigal, E., & Baker, R. (1985). The Role of Competition for Iron and Carbon in Suppression of Chlamydospore Germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *The American Phytopathological Society*, *75*(9).



