

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Manuela Maria Caldas de Oliveira

Estudo da suscetibilidade de *Staphylococcus epidermidis* a tratamento hiperbárico



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Manuela Maria Caldas de Oliveira

Estudo da suscetibilidade de *Staphylococcus epidermidis* a tratamento hiperbárico

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Área de Especialização em Engenharia Clínica

Trabalho realizado sob a orientação da
Professora Isabel Maria Pires Belo
e da
Doutora Margarida Isabel de Barros Coelho

Outubro de 2012

DECLARAÇÃO

Nome: Manuela Maria Caldas de Oliveira

Endereço eletrónico: manuelaoliveira1@hotmail.com

Título dissertação:

Estudo da suscetibilidade de *Staphylococcus epidermidis* a tratamento hiperbárico

Ano de Conclusão: 2012

Ciclo de Estudos Integrados Conducentes ao Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Área de Especialização: Engenharia Clínica

Orientador(es):

Professora Isabel Maria Pires Belo

Doutora Margarida Isabel de Barros Coelho

Escola: de Engenharia

Departamento: Engenharia Biológica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

“Things should be made as simple as possible, but not any simpler” - **Albert Einstein**

AGRADECIMENTOS

Apesar de este trabalho ser de carácter individual, o contributo de várias pessoas foi fundamental para a sua concretização. Aproveito aqui para manifestar os meus sinceros agradecimentos a todos que me apoiaram, encorajaram e ajudaram, de uma forma ou de outra, ao longo deste trabalho.

À minha orientadora, Isabel Belo, quero agradecer por todo apoio, compressão e partilha de conhecimento demonstrados ao longo de todo o período de trabalho neste projeto de dissertação. Agradeço, em especial, a sua simpatia e disponibilidade quando algumas dificuldades laboratoriais surgiram e a professora se prontificou, de imediato, a vestir a bata laboratorial e me ajudar a desmontar e a montar a câmara hiperbárica. Muito obrigada, professora!

Agradeço à Doutora Margarida Martins, co-orientadora deste projeto, primeiramente pelo conhecimento e experiência partilhada no início do trabalho laboratorial, no qual aprendi as técnicas principais e fundamentais para a realização do trabalho laboratorial. Quero agradecer, ainda, por todo seu profissionalismo, atenção dedicada e a enorme disponibilidade demonstrada. Obrigada, Margarida, por tantas vezes me “puxar as orelhas” e me ter ajudado a crescer durante este trabalho!

Quero agradecer também a todos os meus colegas do laboratório de Bioprocessos, do departamento de Engenharia Biológica (DEB). Em especial às meninas IB, Marlene, Adelaide, Patrícia e Cláudia, por todo o apoio que me deram durante o trabalho laboratorial, mesmo durante os contratemplos que surgiram, predispondo-se sempre a ajudar mediante as suas possibilidades, e tendo, de fato, contribuído. Um muito obrigada pelo bom ambiente vivido neste laboratório e pelos deliciosos lanchinhos que partilhámos!

Aos meus amigos quero agradecer toda a amizade e o apoio incondicional demonstrado ao longo deste percurso e por estarem sempre presentes. Um especial obrigada à Ana, Lene, Sara, Thaia, Fia, Carla e Ju! É bom ter amigos como vocês! Carla, pelo teu desde sempre braço amigo. Ju, pela alegria que trazes à minha vida sempre que chego a casa, é muito bom partilhá-la contigo.

Ao meu Di (ogo), agradeço pelo sentido de humor, amor e paciência, especialmente nos momentos menos bons. Obrigada por me fazeres rir desde 2004!

Um especial obrigada à minha querida irmã, Iza, pela amiga e companheira que é e sempre foi. Agradeço por fazeres parte da minha vida e estou certa que juntas venceremos cada batalha!

Finalmente, um agradecimento muito especial aos meus pais, João (Johny) e Laida (Mi) por todo o seu amor, apoio e valores partilhados. E também por todo o suporte financeiro, essencial para a realização deste curso. Um especial obrigada ao meu querido pai, que apesar de atravessar um momento de fragilidade física e emocional, me encoraja sempre com as suas palavras de apoio e me ensina a ser uma pessoa melhor. És o meu grande orgulho, papi!

RESUMO

Atualmente *Staphylococcus epidermidis* é um dos principais agentes responsáveis pelas infecções nosocomiais, como por exemplo a bacteremia e as infecções associadas a dispositivos médicos, estando comumente associado à resistência à antibioterapia convencional. Neste sentido, torna-se emergente o estudo de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções por *S. epidermidis*. O tratamento com oxigénio hiperbárico (OTH) tem sido relatado como um possível método de tratamento de infecções microbianas associadas a *S. epidermidis* e outros organismos aeróbicos. Este tratamento consiste na exposição do *corpo* a avaliar a uma pressão ambiental superior à atmosférica (1 bar). O trabalho desenvolvido na presente dissertação teve como objectivo principal o estudo da susceptibilidade de *S. epidermidis* a tratamento com pressão de ar e oxigénio, e a combinação da pressão de ar com um agente oxidante químico, o peróxido de hidrogénio. Para tal, recorreu-se a uma câmara em aço inoxidável que pode operar a pressões até 10 bar e, para avaliar o efeito na inactivação de *S. epidermidis* foram aplicados tratamentos com ar e O₂ a pressões até 5 bar. Com base nos resultados obtidos foi possível observar que *S. epidermidis* apresenta alguma intolerância ao tratamento com pressão de ar, verificando-se uma redução da viabilidade celular de *S. epidermidis* para ambas as condições testadas, de 3 bar e 5 bar de pressão de ar. Além disso foi possível demonstrar que o aumento da pressão de ar produz um efeito mais acentuado na redução da viabilidade celular desta espécie bacteriana. Relativamente aos ensaios com pressão de O₂, verificou-se que esta pressão provoca efeitos mais adversos na viabilidade de *S. epidermidis* comparando com os observados nos ensaios com pressão de ar. Este resultado sugere que a pressão atua sinergicamente com o O₂. Com os resultados obtidos nestes ensaios, conclui-se ainda que o O₂ é o principal agente de stresse oxidativo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de O₂. Através dos resultados obtidos nos ensaios em que se avaliou o efeito conjugado da pressão de ar com o peróxido de hidrogénio foi observado o aumento da suscetibilidade de *S. epidermidis* apenas no tratamento com pressão de ar a 5 bar. No entanto, não foi possível observar um efeito sinérgico entre a pressão e o agente oxidante químico. Este trabalho permitiu demonstrar que a utilização do ar e O₂ hiperbárico até aos valores testados não constitui uma alternativa clinicamente viável de ser aplicada em doentes, porém pode ser utilizado como um método alternativo para desinfeção de dispositivos médicos.

ABSTRACT

Nowadays *Staphylococcus epidermidis* is amongst the most important pathogenic agents responsible for bloodstream nosocomial infections and for biofilm formation on indwelling medical devices. Moreover the treatment of such infections is a serious problem because these infections are frequently resistant to conventional antibiotics. In this sense, it becomes emergent the study of new therapeutic strategies for treating infections with *S. epidermidis*. The Hyperbaric Oxygen Therapy (HBO) has been reported as a possible method of treatment microbial infections associated with *S. epidermidis* and other aerobic organisms. This treatment is based upon the exhibition to increased atmospheric pressure (1 bar).

Based on this, the aim of this thesis was the study of the effects of air and oxygen pressure and the combination of air pressure with a chemical agent, hydrogen peroxide, on the susceptibility of *S. epidermidis*. Thus, we used a stainless steel chamber which can operate at pressures up to 10 bar, and to evaluate the effect on inactivation of *S. epidermidis* treatments at pressures up to 5 bar were applied with air and O₂.

It was shown that *S. epidermidis* has intolerance to treatment with air pressure and there was observed a reduction in cell viability *S. epidermidis* for conditions tested, 3 bar and 5 bar air pressure. Moreover, it was possible to demonstrate that the increased air pressure produces a greater effect on decrease of cell viability of this species. It was found, in the tests with O₂ pressure, that this pressure causes the most adverse effect on the *S. epidermidis* viability, compared with those observed in assays with air pressure. This result suggests that the pressure acts synergistically with O₂. In addition, the results indicate that O₂ is the principal agent of oxidative stress due to increased production of oxygen reactive species. The response of *S. epidermidis* to air pressure with hydrogen peroxide was also studied. It was observed that susceptibility of *S. epidermidis* increased only in the treatment with air pressure to 5 bar. However, we could not observe a synergistic effect between pressure and chemical oxidant agent.

This work has demonstrated that moderate air pressures, such as that was experimentally applied, are not clinically applicable for patients but could be used as a method for disinfection of medical devices.

NOMENCLATURA

Lista de abreviaturas

PBS- *Phosphate Buffered Solution*- Tampão Fosfato Salino

SEM- *Scanning Electron Microscopy*- Microscopia Electrónica de Varrimento

ANOVA- *Analysis of variance*- análise de variância

CFU- *Colony forming units*- unidade formadora de colónias

TSA- *Tryptic Soy Agar*

TSB- *Tryptic Soy Broth*

OTH- Oxigenioterapia hiperbárica

UHMS- *Undersea and Hyperbaric Medical Society*

ECHM- *European Committee for Hyperbaric Medicine*

pO₂- Pressão parcial de oxigénio

MSSA- *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*

MRSA- *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | v |
| Resumo | vii |
| Abstract..... | viii |
| Nomenclatura..... | ix |
| Índice de conteúdos | xi |
| Índice de figuras | xv |
| Índice de tabelas | xvii |
| I Introdução..... | 1 |
| 1.1 Enquadramento do trabalho | 1 |
| 1.2 Objetivos..... | 2 |
| 2 Revisão bibliográfica..... | 3 |
| 2.1 <i>Staphylococcus spp.</i> | 3 |
| 2.1.1 <i>S. epidermidis</i> | 4 |
| 2.1.1.1 Infecções por <i>S. epidermidis</i> | 5 |
| 2.1.2 Resistência antibiótica | 6 |
| 2.1.1 Profilaxia das infeções por <i>Staphylococcus</i> | 8 |
| 2.1.2 Abordagem terapêutica das infeções por <i>Staphylococcus</i> | 9 |
| 2.2 Medicina hiperbárica | 11 |
| 2.2.1 Oxigenioterapia Hiperbárica (OTH)..... | 11 |
| 2.2.1.1 Administração | 12 |
| 2.2.1.2 Indicações terapêuticas..... | 14 |
| 2.2.1.3 Efeitos indesejáveis | 17 |
| 2.2.1.4 Física da OTH | 18 |
| 2.2.1.5 Princípios fisiológicos | 20 |
| 2.2.1.6 Efeito sobre microrganismos..... | 21 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.3 | Aplicação do tratamento hiperbárico a infeções por Staphylococci..... | 24 |
| 3 | Material e métodos | 29 |
| 3.1 | Microrganismo..... | 29 |
| 3.1.1 | Meios de cultura | 29 |
| 3.1.2 | Condições de armazenamento e manutenção | 29 |
| 3.1.3 | Preparação da cultura e crescimento de <i>S. epidermidis</i> | 30 |
| 3.2 | Ensaio <i>S. epidermidis</i> com peróxido de hidrogénio | 30 |
| 3.3 | Câmara hiperbárica | 30 |
| 3.3.1 | Características da câmara hiperbárica | 31 |
| 3.3.2 | Condições de operação | 32 |
| 3.3.2.1 | Amostragem | 32 |
| 3.3.3 | Lavagem e desinfeção da câmara hiperbárica | 32 |
| 3.4 | Ensaio na câmara hiperbárica..... | 33 |
| 3.4.1 | Efeito da pressão..... | 33 |
| 3.4.2 | Efeito de Oxigénio Puro (100%) | 33 |
| 3.4.3 | Efeito da pressão conjugado com o agente químico - peróxido de hidrogénio..... | 33 |
| 3.4.4 | Ensaio Controlo | 34 |
| 3.5 | Método analítico | 34 |
| 3.5.1 | Determinação da concentração celular- Método das unidades formadoras de colónias | 34 |
| 3.6 | Análise estatística | 34 |
| 4 | Resultados e discussão | 37 |
| 4.1 | Suscetibilidade de <i>S. epidermidis</i> a pressão de ar..... | 37 |
| 4.2 | Suscetibilidade das células de <i>S. epidermidis</i> a pressão de oxigénio puro | 41 |
| 4.3 | Suscetibilidade das células de <i>S. epidermidis</i> ao efeito conjugado da pressão de ar com o peróxido de hidrogénio..... | 45 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.1 | Efeito de peróxido de hidrogénio em <i>S. epidermidis</i> | 45 |
| 4.3.2 | Efeito conjugado da pressão de ar com peróxido de hidrogénio em <i>S. epidermidis</i> | 46 |
| 5 | Conclusões e perspetivas futuras | 49 |
| 6 | Referências Bibliográficas..... | 51 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Imagem da espécie <i>S. epidermidis</i> . A- Imagem de microscopia óptica com coloração de gram de <i>S. epidermidis</i> B- Imagem de biofilme de <i>S. epidermidis</i> obtida por SEM..... | 5 |
| Figura 2: Exemplos de dispositivos médicos nos quais estão associadas infeções <i>S. epidermidis</i> . A- Cateter venoso; B- Lente ocular. | 6 |
| Figura 3: Imagem representativa de uma câmara hiperbárica mono-lugar..... | 14 |
| Figura 4: Imagem representativa de uma câmara hiperbárica multi-lugar..... | 14 |
| Figura 5: Imagem ilustrativa das espécies reativas de O ₂ . A- Interconvenção das espécies reativas de oxigénio nos sistemas químicos e Biológicos. B- Activação da molécula de O ₂ | 24 |
| Figura 6: Esquema da instalação da câmara hiperbárica: I- sistema de pressurização, VA- válvula anti-retorno, V1, V4- válvulas tudo ou nada, V3- válvula de regulação, V2- válvula de amostragem. II- Câmara hiperbárica..... | 31 |
| Figura 7: Fotografia da câmara hiperbárica Whitey de 0,3 L. | 32 |
| Figura 8: Suscetibilidade de <i>S. epidermidis</i> pressurizada com ar a 3 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar..... | 38 |
| Figura 9: Suscetibilidade de <i>S. epidermidis</i> pressurizada com ar a 5 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar..... | 39 |
| Figura 10: Suscetibilidade de <i>S. epidermidis</i> a O ₂ pressurizado a 3 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar..... | 42 |
| Figura 11: Suscetibilidade de <i>S. epidermidis</i> a O ₂ pressurizado a 5 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar..... | 42 |
| Figura 12: Suscetibilidade de <i>S. epidermidis</i> ao H ₂ O ₂ às várias concentrações (1%, 2%, 3%). O controlo foi realizado sem adição de H ₂ O ₂ . O tracejado representa o limite de deteção do método analítico. | 45 |
| Figura 13: Suscetibilidade de <i>S. epidermidis</i> a 1% de H ₂ O ₂ com pressão de ar a 3 bar ao longo de 3 e 5 h do tempo. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar. | 47 |

Figura 14: Suscetibilidade de *S. epidermidis* a 1% de H_2O_2 com pressão de ar a 5 bar ao longo de 3 e 5 h do tempo. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar. 47

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Indicações Recomendadas da OTH | 16 |
| Tabela 2: Quantidade de O ₂ dissolvido no plasma | 19 |

I Introdução

Nesta primeira seção pretende-se contextualizar o leitor para o tema escolhido para o desenvolvimento desta dissertação através de um breve enquadramento. Referem-se, ainda, os principais objetivos propostos para a realização do trabalho experimental.

1.1 Enquadramento do trabalho

As patologias associadas a infeções têm vindo a assumir relevância crescente a nível mundial. Atualmente, em particular as infeções nosocomiais são consideradas um problema, crescendo tanto em incidência quanto em complexidade, originando diversas implicações tanto sociais como económicas e estão entre as causas mais importantes de morte e morbidade nos doentes hospitalizados.

Vários fatores contribuem para a frequência de infeções nosocomiais, nomeadamente o estado de saúde do doente internado, as técnicas terapêuticas utilizadas (por exemplo, técnicas invasivas), as práticas de prestação de cuidados aos doentes, assim como o ambiente hospitalar. Estes fatores podem facilitar a transmissão de microrganismos entre os doentes e profissionais de saúde e assim desencadear uma infeção hospitalar.

Diversos agentes patogénicos estão associados a infeções nosocomiais, variando o tipo de microrganismo consoante o tipo de doentes, de instituições de saúde e de país. Importa salientar que bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativos*, nomeadamente *Staphylococcus epidermidis*, estão comumente associadas a este tipo de infeções. Comumente a antibioterapia é o tratamento utilizado neste tipo de infeções. Contudo, a sobre utilização e utilização inapropriada de antibióticos desencadeou insucesso na utilização desta terapêutica. Tem vindo a ser observado um aumento da resistência bacteriana a vários agentes antimicrobianos e mesmo, em alguns casos, a quase todos eles. As falhas associadas aos tratamentos de infeções com bactérias (multi)-resistentes levam a um aumento da morbidade e mortalidade, particularmente entre doentes com doenças subjacentes graves e imunodeprimidos. A resistência aos antimicrobianos é um problema da comunidade, assim como das instituições de saúde mas, nos hospitais, a transmissão cruzada é intensificada pelo facto de a população ser altamente suscetível.

Recentemente, a oxigenioterapia surgiu como uma nova técnica terapêutica primária ou adjuvante no tratamento de uma série de patologias, nomeadamente infeções bacterianas.

Posto isto, é de extrema importância avaliar o comportamento dos microrganismos a esta nova terapêutica, incidindo este trabalho nesta avaliação especificamente para *S. epidermidis*.

1.2 Objetivos

No âmbito deste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito do tratamento hiperbárico (pressão), da oxigenioterapia (pressão e O₂) e do efeito conjugado da pressão de ar com o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) na viabilidade bacteriana.

Para tal, escolheu-se a *S. epidermidis* e variaram-se diversas condições, tais como: o tempo de exposição, a pressão de ar e a pressão de O₂ puro.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se:

- Avaliar a suscetibilidade de *S. epidermidis* a pressão de ar;
- Avaliar a suscetibilidade de *S. epidermidis* a pressão de O₂ puro;
- Avaliar a suscetibilidade de *S. epidermidis* ao efeito conjugado da pressão de ar com o peróxido de hidrogénio

2 Revisão bibliográfica

Nesta segunda seção pretende-se, através de uma significativa recolha bibliográfica, abordar e desenvolver vários fundamentos teóricos, de forma a permitir a compreensão dos vários temas presentes neste documento. Pretende-se também possibilitar a análise da evolução científica nesta área.

Destacam-se dois temas principais:

- *Staphylococcus spp.*;
- Medicina hiperbárica.

2.1 *Staphylococcus spp.*

Em 1878 Robert Koch isolou e descreveu o género *Staphylococcus* pela primeira vez. Trata-se de um género de bactérias Gram-positivas caracterizadas por células esféricas, com diâmetro compreendido entre 0,5 – 1,5 µm, apresentando-se como células simples, aos pares, ou mais frequentemente, agrupadas em cachos (Sousa, 2009; Gomes, 2012).

A origem do nome *Staphylococcus* advém da sua organização celular, uma vez que deriva de duas palavras gregas: ‘*staphyle*’- cacho de uvas- e ‘*kókkos*’- semente ou grão. Estas bactérias são imóveis, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, podendo viver em meios aeróbios (Sousa *et al.*, 2002).

Em 1884, Friedrich Julius Rosenbach descreveu duas espécies que denominou de “*aureus*” (amarelo) e “*albus*” (branco), relacionando a presença/ausência de pigmento. Mais tarde esta última espécie foi denominada de *Staphylococcus epidermidis* (Kloos and Schleifer, 1975).

As bactérias *Staphylococcus* vivem em contacto íntimo com o Homem, sendo que muitas espécies constituem grande parte da população microbiana da pele e mucosas (O’Gara and Humphreys, 2001). Dentre as 46 espécies de *Staphylococcus* descritas, as espécies mais frequentemente associadas a infecções humanas são *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, sendo *S. aureus* conhecido pela sua elevada patogenicidade (Gomes, 2012).

Estas bactérias são responsáveis pela produção de diversas enzimas, no entanto a coagulase assume particular importância. A capacidade de produzir esta enzima divide as espécies em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positivos e *Staphylococcus* coagulase negativos. Dentre as espécies patogénicas para o Humano, apenas uma, *S. aureus*, a produz. Todas as restantes são não produtoras de coagulase (Sousa *et al.*, 2002).

2.1.1 *S. epidermidis*

Atualmente a bactéria *S. epidermidis* (figura 1, A e B) é considerada a espécie mais importante de *Staphylococcus* coagulase-negativos. Uma vez que esta espécie se encontra amplamente distribuída pela superfície do corpo humano (O'Gara and Humphreys, 2001), como anteriormente foi referido, e sendo a espécie mais frequentemente isolada do epitélio humano, geralmente mantém uma relação benigna com o hospedeiro (Otto, 2009).

Ao longo dos anos as espécies *Staphylococcus* coagulase-negativos, em particular *S. epidermidis*, surgiram como agentes patogénicos nosocomiais importantes e oportunistas de infeção (Vuong and Otto, 2002; Sousa, 2009). Este facto deveu-se ao crescente desenvolvimento da medicina e conseqüente aumento e aperfeiçoamento de novas técnicas invasivas, bem como de novas práticas de tratamento (por exemplo, quimioterapia), que por sua vez influenciam negativamente o estado imunológico dos pacientes.

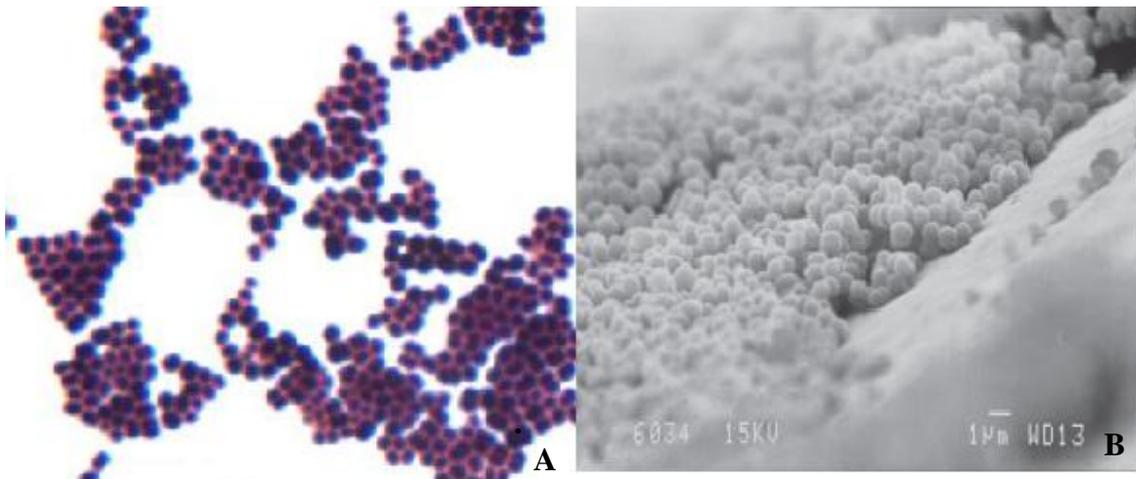


Figura 1: Imagem da espécie *S. epidermidis*. A- Imagem de microscopia óptica com coloração de gram de *S. epidermidis* (<http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/117-1.jpg>, acessado em 10/12/2012); B- Imagem de biofilme de *S. epidermidis* obtida por SEM (adaptado de: Maureen *et al.*, 2008).

2.1.1.1 Infeções por *S. epidermidis*

A espécie *S. epidermidis* está associada a um grande número de infecções relacionadas com os dispositivos médicos, como por exemplo endocardites (próteses vasculares) (Otto, 2009), bacteremia (cateteres intravasculares, figura 2- A)(Winston *et al.*, 1983), peritonites (cateteres de diálise peritoneal) (Eiff *et al.*, 1998). Além das infecções citadas ocorrem também infecções associadas a próteses oculares (figura 2- B) (Vuong and Otto, 2002), próteses ortopédicas (Martins, 2009), próteses mamárias ou *shunts* do sistema nervoso central (Goldmann and Pier, 1993; Sousa *et al.*, 2002; Ziebuhr *et al.*, 2006).

Na realidade, a patogenicidade das infecções causadas a *S. epidermidis* está associada à capacidade desta espécie colonizar as superfícies dos dispositivos médicos, produzindo biofilme (figura 1, B) (Mack *et al.*, 2004). A formação de biofilme compreende várias etapas, mas resumidamente pode-se definir por duas etapas principais: em primeiro lugar as bactérias aderem rapidamente ao material do dispositivo médico e durante a fase de acumulação seguinte, as bactérias proliferam sobre a superfície do dispositivo médico, levando à colonização do substrato (Eiff *et al.*, 2002). Consequentemente, a formação de biofilme resulta num aglomerado de bactérias envolvido numa matriz exopolimérica (Vuong and Otto, 2002; Sousa, 2009).

Por outro lado, é sabido que a espécie *S. epidermidis* não está apenas associada a infecções que afetam dispositivos médicos. Esta bactéria afeta frequentemente doentes internados em meio hospitalar mas não pacientes externos (Ziebuhr *et al.*, 2006). Por

exemplo, *S. epidermidis* é responsável por casos de osteomielite (processo inflamatório agudo ou crônico no osso), infecções de feridas, otite média (inflamação do forro mucoperiosteal, no ouvido médio), endoftalmite (inflamação das cavidades intraoculares), meningite, infecções do trato urinário e pneumonia (Sousa, 2009). Isto deve-se ao facto de as infecções causadas por esta espécie afetarem principalmente pacientes imunocomprometidos, em estado crítico (indivíduos que recebem terapia imunossupressora, pacientes portadores de HIV e recém nascidos) (Vuong and Otto, 2002) e/ou que permanecem hospitalizados por um longo período de tempo (Eiff *et al.*, 2001; Eiff *et al.*, 2002). Lis *et al.* (2009) realizaram um estudo em meio hospitalar onde descreveram que *S. epidermidis* é a espécie *Staphylococcus* predominante no ar hospitalar, sendo também a mais encontrada nos blocos operatórios. Neste estudo identificaram ainda a presença desta bactéria na casa de pessoas que haviam estado em ambiente hospitalar. É importante referir que os biofilmes são a causa maior na erradicação das infecções por *S. epidermidis*, uma vez que a aglomeração multicelular apresenta resistência intrínseca a antibióticos e a mecanismos de defesa do hospedeiro (Vuong and Otto, 2002; Rodrigues, 2011).

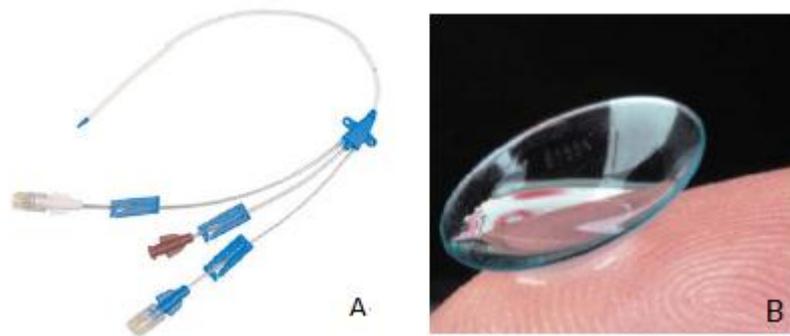


Figura 2: Exemplos de dispositivos médicos nos quais estão associadas infecções *S. epidermidis*. A- Cateter venoso; B- Lente ocular. (Adaptado de Sousa, 2009)

2.1.2 Resistência antibiótica

As bactérias do género *Staphylococcus*, em particular *S. epidermidis* e *S. aureus*, têm vindo a ser consideradas um problema emergente por todo o mundo, estando este potenciado pela resistência microbiana a antibióticos e capacidade de formação de

biofilme que conseqüentemente representa uma barreira impermeável aos antibióticos para alguns antibióticos (Eiff *et al.*, 2002).

Vários autores relataram que as espécies que formam biofilme são intrinsecamente mais resistentes a antibióticos e à defesa do hospedeiro do que as células planctônicas da mesma espécie (John and Harvin, 2007; Rodrigues, 2011). Este fator deve-se às menores taxas de transporte de massa de moléculas antimicrobianas para as células associadas do biofilme ou devido às diferenças fisiológicas das células do biofilme em relação às células planctônicas (Sousa, 2009). Neste sentido, as concentrações de antimicrobiano necessário para inativar as bactérias planctônicas não são geralmente as indicadas para inativar as bactérias em biofilme. Adicionalmente, a resposta imunitária não é eficaz contra as infecções por biofilme, uma vez que mecanismos de defesa do hospedeiro, não são suficientes para eliminar as células em biofilme (Rodrigues, 2011).

A resistência de células planctônicas de *Staphylococcus* a antibióticos remonta a 1942, onde foi registrado o primeiro caso de resistência à penicilina em ambiente hospitalar. Mais tarde foram também reconhecidas resistências a este antibiótico na comunidade (Lowy, 2003).

É conhecido que estirpes de *S. epidermidis*, em particular, desenvolveram resistências a diversos antibióticos. A resistência à meticilina é observada em 75-90% dos isolados desta espécie nas instituições hospitalares (Otto, 2009). Adicionalmente, tem sido descrita a resistência de *S. epidermidis* à rifamicina, flouroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, sulfonamidas (Otto, 2009), ampicilina e ciprofloxacina (Michelim *et al.*, 2005). Apesar das resistências adquiridas aos antibióticos acima referidos, 80% das infecções associadas a cateteres causadas por *S. epidermidis* podem ser tratadas, com recurso a vancomicina não sendo necessária a remoção do cateter. No entanto, resistência intermédia a este antibiótico já foi também descrita (Vuong and Otto, 2002; Otto, 2009; Theisen, 2010).

Certas combinações de antibióticos, frequentemente contendo rifampicina, foram reportadas como sendo bactericidas contra 90% de biofilmes. No entanto, como já foi anteriormente referido, essas combinações de antibióticos não são tão eficazes contra os biofilmes como demonstram ser no combate a células planctônicas (John and Harvin, 2007).

Atendendo àquilo que foi descrito anteriormente, o crescente aumento da resistência a muitos antibióticos tem contribuído para a maior dificuldade no tratamento de infeções causadas por *Staphylococcus* (Gould, 2009). Desta forma torna-se evidente que é necessário adotar medidas preventivas para o controlo deste tipo de infeções.

2.1.1 Profilaxia das infeções por *Staphylococcus*

As infeções associadas a instituições hospitalares são preocupantes tanto para a saúde dos pacientes como a dos profissionais de Saúde. Espécies de *Staphylococcus*, particularmente *S. epidermidis* e *S. aureus*, são responsáveis pelo desenvolvimento de infeções nosocomiais. Adicionalmente sabe-se que as infeções associadas a estirpes resistentes a antibióticos e também a resistência inerente do biofilme a antibióticos são os fatores mais preocupantes deste tipo de infeções. Neste sentido, emerge a necessidade de desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção (O'Gara and Humphreys, 2001).

A transmissão deste tipo de infeções ocorre frequentemente por contacto direto, no qual as mãos são um dos principais veículos de transmissão. A lavagem das mãos com sabão e o uso de desinfetantes como o álcool, antes e após o contacto com o doente, são consideradas as formas mais eficazes de reduzir a contaminação cruzada (Martins, 2009).

Dentre os procedimentos hospitalares, a cirurgia é o fator que mais contribui para o risco de infeção nosocomial, pelo que o bloco operatório é o local onde há maior prevalência destas infeções (Gelape, 2007). As intervenções de controlo de infeção comumente aplicadas neste local incluem o uso de profilaxia com antibióticos, procedimentos de higiene durante a colocação de cateteres, antisepsia da pele, irrigação da pele e outras medidas como esterilização dos dispositivos médicos (O'Gara and Humphreys, 2001), sistemas de exaustão de ar, iluminação ultravioleta e fecho das portas do bloco operatório (Brennan *et al.*, 2009).

Brennan *et al.* (2009) num estudo em que avaliaram a presença de bactérias patogénicas em torquinetes utilizados na cirurgia ortopédica, verificaram que estes materiais representam um foco de infeção de *Staphylococcus* coagulase-negativos e *S. aureus*. Os autores demonstraram ainda que o uso de desinfetantes antes da utilização destes instrumentos era altamente vantajoso na redução do risco de contaminação. Neste

sentido, a limpeza e desinfecção realizada frequentemente antes da adesão das bactérias à superfície pode ser outra medida de prevenção de infecções (Simões *et al.*, 2010).

Particularmente para as infecções por *Staphylococcus* associadas a biofilme várias estratégias têm vindo a ser aplicadas para prevenir a formação de biofilme. Estas centram-se na eliminação ou inibição das células planctónicas antes da sua adesão à superfície e posterior desenvolvimento de biofilme (Rodrigues, 2011). Este tipo de abordagem tem sido foco de vários estudos e demonstram ser uma forma eficaz de minimizar este tipo de infecções (O'Gara and Humphreys, 2001). Atualmente as abordagens utilizadas para dificultar a adesão das bactérias centram-se no revestimento e modificação das propriedades físico-químicas da superfície com diferentes agentes, como por exemplo ouro, prata e antibióticos, ou a colocação de específicos péptidos e polímeros sobre a superfície (Sousa, 2009; Rodrigues, 2011). Por outro lado, a limpeza e desinfecção realizada frequentemente antes da adesão das bactérias à superfície pode ser outra medida de prevenção de infecções (Simões *et al.*, 2010).

Todavia, quando estas medidas preventivas não são totalmente eficazes podem ocorrer as infecções acima referidas. De seguida são apresentadas as abordagens terapêuticas utilizadas no combate a infecções por *Staphylococcus*.

2.1.2 Abordagem terapêutica das infecções por *Staphylococcus*

Em casos de infecção por *Staphylococcus* o tratamento pode ser conseguido através de duas abordagens: a terapia antibiótica e/ou tratamento cirúrgico (Sousa *et al.*, 2002).

Especificamente no tratamento de infecções causadas por *S. epidermidis* são tradicionalmente utilizados antibióticos como por exemplo a vancomicina, tetraciclina e rifampicina. Adicionalmente, devido ao crescente aparecimento de microrganismos multirresistentes tem-se recorrido em alguns casos à combinação de antibióticos como uma opção terapêutica no tratamento de infecções por esta espécie bacteriana. Os biofilmes, por exemplo, são geralmente resistentes a monoterapia (apenas um antibiótico), no entanto são frequentemente suscetíveis a antimicrobianos combinados. Vários autores relataram que combinações como por exemplo de rifampicina com clindamicina e rifampicina com gentamicina são eficazes contra os biofilmes de *S. epidermidis* (Gomes *et al.*, 2011).

Por outro lado, novos agentes antimicrobianos têm-se revelado alternativas para ultrapassar a resistência a antimicrobianos. Por exemplo, a daptomicina, a tigeciclina, a minociclina (Raad *et al.*, 2007), a linezolida e a dalbavancina (Gomes *et al.*, 2011) têm-se revelado eficazes no combate das infecções associadas a dispositivos médicos. A linezolida, por exemplo, é excelente contra a maioria das infecções sistêmicas por *Staphylococcus* (Leite *et al.*, 2011).

Leite *et al.* (2011) relataram que a daptomicina poderia ser considerada uma alternativa à rifampicina, uma vez que este antibiótico apresenta um elevado risco de desenvolvimento de resistência quando utilizado como monoterapia.

Apesar dos esforços para tratar infecções associadas a biofilmes com a convencional antibioterapia (monoterapia ou em combinação), a remoção física do dispositivo médico infectado é frequentemente a solução mais indicada para o tratamento, tendo em conta que a formação de biofilme confere resistência intrínseca a agentes antimicrobianos (Gomes *et al.*, 2011). No entanto, esta abordagem terapêutica acarreta um custo económico e de saúde (Cerca *et al.*, 2005).

Neste sentido, a investigação científica tem apostado no estudo e desenvolvimento de terapias alternativas que permitam a redução e o tratamento eficaz destas infecções (Gomes *et al.*, 2011). Por exemplo, atualmente o interesse no estudo de substâncias naturais como possíveis alternativas aos antibióticos e a novos agentes antimicrobianos, nomeadamente os compostos naturais produzidos por plantas, cujos compostos bioativos são bem conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas, é emergente e está no foco biotecnológico. Vários estudos têm relatado o potencial antimicrobiano das principais classes de compostos antimicrobianos das plantas, nomeadamente os ácidos fenólicos e polifenóis, terpenóides (óleos essenciais), alcalóides, lectinas e polipeptídeos (Cowan, 1999). Especificamente, o farnesol é um sesquiterpenóide que demonstrou ser um potencial agente antimicrobiano contra culturas planctónicas de *S. epidermidis* (Gomes *et al.*, 2009).

Por outro lado, o uso de bacteriófagos (ou simplesmente fagos) para o tratamento de infecções bacterianas tem sido considerado uma abordagem potencialmente valiosa. Os fagos são vírus que têm a capacidade de infectar as bactérias, multiplicar-se dentro destas e destruí-las. Esta espécie é muito eficaz como agente antibacteriano e possui muitas vantagens sobre os antibióticos (Melo *et al.*, 2011), uma vez que os fagos podem

ser eficazes na destruição de bactérias que adquiriram resistência aos antibióticos. Esta característica excepcional determina que se deve aplicar fagos no tratamento de infecções bacterianas resistentes a antibióticos (Międzybrodzki *et al.*, 2007). Um estudo realizado em pacientes com otite média pós-gripe, onde foram identificadas no ouvido direito e no ouvido esquerdo, a *S. epidermidis* e *S. hominis* respectivamente, concluiu que a terapia bacteriofágica combinada com a administração de lactoferrina é um tratamento eficaz em infecções antibiótico-resistentes do ouvido externo (Weber-Dabrowska *et al.*, 2006).

Além das terapias supracitadas, o tratamento com oxigênio hiperbárico tem sido relatado como um método a considerar no tratamento de infecções (Edwards, 2010b). De seguida, encontram-se descritos os princípios associados a esta terapia, bem como as indicações terapêuticas.

2.2 Medicina hiperbárica

A medicina hiperbárica refere-se ao estudo e tratamento de patologias sob exposição a ambiente hiperbárico. A oxigenioterapia é a terapêutica estudada e prescrita por esta área médica (Fernandes, 2009). Assim, a medicina hiperbárica engloba a terapêutica hiperbárica e a oxigenioterapia. A terapêutica hiperbárica envolve a inalação de ar e de misturas gasosas respiráveis hiperoxigenadas a uma pressão ambiente superior à pressão atmosférica no interior de compartimentos estanques pressurizados (Sousa, 2011). Por outro lado, a oxigenioterapia hiperbárica (OTH) é considerada uma vertente da terapêutica hiperbárica, a qual se baseia na inalação de oxigênio puro (O₂) em ambiente hiperbárico (Sousa, 2011).

Este tipo de terapêutica está subdividido em duas áreas: a medicina do trabalho e a aplicação clínica da OTH em ambiente hospitalar. A medicina hiperbárica começou por ser aplicada a mergulhadores, aeronautas e trabalhadores sob ar-comprimido, a fim de tratar as patologias causadas pelas práticas profissionais e só posteriormente é que foi introduzida em instituições hospitalares (Sousa, 2011).

2.2.1 Oxigenioterapia Hiperbárica (OTH)

As primeiras referências à OTH datam de 1662 com o médico britânico Henshaw. Este observou que indivíduos com feridas crónicas, habitantes em zonas de altitude elevada,

apresentavam uma melhoria na recuperação das suas feridas e, também, do seu estado de saúde geral, quando tratados em centros de tratamento localizados na costa. Henshaw concluiu que esse facto se devia à diferença de pressão atmosférica entre ambos os locais. Baseando-se na sua teoria, construiu uma câmara metálica na qual começou a aplicar “banhos de ar comprimido”, com pressão superior à atmosférica. Deste modo, Henshaw, empiricamente introduziu a base do que mais tarde viria a dar origem à OTH (Pinto *et al.*, 2003; Gill and Bell, 2004).

No entanto, relatos dos efeitos tóxicos de oxigénio em excesso por Lavoisier e Seguin contribuíram para o ceticismo e hesitação do uso da OTH (Edwards, 2010a). Apesar da ideia prevalecte de que o excesso de oxigénio era tóxico, esta terapêutica começou a ser utilizada há cerca de 50 anos, de onde datam as primeiras referências com base científica da OTH (Desola, 1998; Sousa, 2007).

A *Undersea and Hyperbaric Medical Society*, fundada em 1967, o *Hyperbaric Oxygen Committee*, fundado em 1976 pela UHMS, a *European Underwater Baromedical Society* (EUBS), fundada em 1965, o *European Committee for Hyperbaric Medicine* (ECHM) criado em 1991, são sociedades internacionais criadas ao longo dos últimos anos, a fim de promover e esclarecer a atividade desta terapêutica (Fernandes, 2009).

A OTH foi definida pela UHMS como um tratamento que consiste na inalação, de forma intermitente, de oxigénio a 100% a pressões superiores a 1 bar (Tibbles and Edelsberg, 1996; Leach *et al.*, 1998; Gill and Bell, 2004).

O aumento de pressão resulta num acréscimo muito significativo da pressão arterial de O₂, bem como a pressão tecidual de O₂ (2,67 bar e 0,53 bar respetivamente). Estas doses de O₂ estão na base da maioria dos efeitos benéficos fisiológicos, celulares, bioquímicos que estão implícitos na terapêutica do oxigénio hiperbárico (Tibbles and Edelsberg, 1996).

Importa referir que a OTH é uma terapêutica não invasiva, pelo que se trata de um procedimento médico indolor para o utilizador.

2.2.1.1 Administração

O tratamento com OTH é realizado no interior de compartimentos estanques capazes de suportar pressões superiores a 1 bar (100 kPa) – câmaras hiperbáricas - nas quais se

respira O₂ a 100% ou outros gases. Estas câmaras podem ser mono-lugar ou multi-lugar, dependendo do número de pacientes que alojam (Fernandes, 2009).

As câmaras mono-lugar (figura 3) são de pequeno volume, têm apenas capacidade para um paciente e o O₂ é inalado diretamente do ambiente da câmara. Atualmente são cada vez menos utilizadas, porque são pressurizadas com O₂ o que leva a um risco acrescido de incêndio e deflagração (Desola, 1998). O facto do paciente se poder sentir desconfortável devido ao ambiente claustrofóbico e também a impossibilidade de serem administrados cuidados médicos durante a sessão de tratamento são outras das razões que levaram ao desuso deste tipo de câmara (Sousa, 2007).

As câmaras multi-lugar (figura 4) são pressurizadas com ar comprimido, podem alojar vários pacientes em simultâneo e o O₂ puro, ou outros gases respiráveis, são administrados em circuito semi-aberto via uma máscara facial, tenda encefálica ou tubo endotraqueal (Sousa, 2007; Fernandes, 2009). Este tipo de circuito minimiza o risco de incêndio e deflagração, uma vez que as concentrações de O₂ existentes no interior da câmara, raramente excedem os valores de segurança recomendados (22,5%) (Sousa, 2007). Neste tipo de câmara os pacientes são acompanhados e assistidos, quando necessário, por profissionais especializados (Desola, 1998).

As condições de tratamento dependem normalmente da patologia a tratar (Thom, 2011) e o número de sessões pode variar de três a cinco para condições agudas e de 50 a 60 para pacientes com doenças causadas por radiação (Sahni *et al.*, 2004).

Por exemplo, no caso da mionecrose por *Clostridium*, a UHMS recomenda 3 sessões de 90 min a 3 bar que devem ser feitas nas primeiras 24 h, seguidas de 2 sessões diárias de tratamento durante 4 a 5 dias (Gill and Bell, 2004).

Como refere Sousa (2007) a duração e a pressão máxima de trabalho das sessões de OTH, estão limitadas a 3 bar e a 120 minutos, como forma de prevenção da ocorrência dos efeitos tóxicos da hiperóxia, neurológicos e respiratórios.



Figura 3: Imagem representativa de uma câmara hiperbárica mono-lugar. (Adaptado de: Fernandes, 2009)



Figura 4: Imagem representativa de uma câmara hiperbárica multi-lugar. (Adaptado de: Fernandes, 2009)

2.2.1.2 Indicações terapêuticas

Nos últimos 50 anos, a OTH tem sido recomendada e aplicada em diversas condições médicas. Frequentemente foi utilizada sem a adequada validação científica de eficácia e de segurança e conseqüentemente desenvolveu-se um elevado grau ceticismo na comunidade médica sobre o uso desta terapêutica (Sahni *et al.*, 2004). Contudo, ao

longo dos anos, várias organizações internacionais supracitadas têm-se reunido com o objetivo de promover consenso relativamente às indicações terapêuticas da OTH (Fernandes, 2009).

Durante as últimas quatro décadas estudos e experiências clínicas demonstraram uma razoável evidência clínica no tratamento ou experiência clínica validada. Por exemplo, o uso clínico da OTH no tratamento de gangrena gasosa (GG) (Brown and Huggett) e infecções necrotizantes de partes moles foi relatado pela primeira vez num estudo efetuado por Brummelkamp e os seus colaboradores em 1961, no qual foi observado o sucesso da OTH juntamente com antibioterapia e a cirurgia em 26 casos de GG (Wu and Lieber, 2001). Estudos realizados por Chen e seus colaboradores (2004) demonstraram que em 12 de 13 doentes com osteomielite crónica refratária no fémur ocorreu cicatrização completa da ferida, aplicando em conjunto o desbridamento cirúrgico, antibioterapia e a OTH a 2,5 bar. O sucesso da OTH como adjuvante a terapias anteriormente referidas foi também comprovado por Riseman *et al.* (1990) quando estes compararam os resultados em pacientes com fascíte necrotizante com e sem o recurso a OTH num período de 8 anos. Estes autores recomendaram ainda o uso rotineiro de OTH como adjuvante no tratamento deste tipo de infeção (Riseman *et al.*, 1990).

Os estudos iniciais popularizaram o uso desta terapia e assim surgiram novas experiências clínicas que validaram a aplicação da OTH (Wu and Lieber, 2001) para uma série de indicações clínicas (Sahni *et al.*, 2004).

Segundo a ECHM existem recomendações baseadas na evidência científica, para a OTH, estando divididas em três tipos, a saber:

-Recomendação tipo 1: patologias em que a OTH é fortemente recomendada, podendo contribuir para a alteração do prognóstico vital;

-Recomendação tipo 2: patologias em que a OTH é parte importante do tratamento e, se não altera o prognóstico vital, pode, pelo menos, prevenir complicações sérias;

-Recomendação tipo 3: patologias em que a OTH é opcional, sendo considerada uma medida de apoio ao restante tratamento (Fernandes, 2009).

Na tabela 1 apresentam-se o resumo das indicações recomendadas para OTH de acordo com o tipo de recomendações. Dentre as indicações terapêuticas mais frequentes e

relevantes para a OTH destacam-se as seguintes: Intoxicação por monóxido de carbono, doença descompressiva (DD), embolismo gasoso, mionecrose por *Clostridium* – gangrena gasosa, osteomielite, infeções necrotizantes de partes moles (não clostridiais), isquemia traumática aguda, lesões rádio-induzidas, pé diabético, úlceras Isquémicas e feridas de difícil cicatrização e surdez súbita (Fernandes, 2009) e mais recentemente Medicare aprovou também a actinomicose refratária como indicação terapêutica da OTH (Wu and Lieber, 2001).

Tabela 1: Indicações Recomendadas da OTH (Adaptado de: Fernandes, 2009)

| Recomendação de Tipo I | Recomendação de Tipo II | Recomendação de Tipo III |
|---|--|--|
| Intoxicação por Monóxido de Carbono | Lesão do Pé Diabético | Encefalopatia Pós-Anóxica |
| Síndrome de Esmagamento | Retalho de pele ou músculo cutâneo comprometido | Radionecrose Laríngea |
| Infeções bacterianas por anaeróbios ou mistas anaeróbicas | Osteoradionecrose (outros ossos que não mandíbula) | Lesão do Sistema Nervoso Central radio-induzida |
| Osteoradionecrose (mandíbula) | Proctite/enterite radio-induzida | Síndrome de reperfusão pós-procedimento vascular |
| Radionecrose de tecidos moles (cistite) | Lesões dos tecidos moles radio-induzidas | Reimplantação de Membro |
| Doença Descompressiva | Cirurgia e implante em tecidos irradiados (acção preventiva) | Queimaduras de 2º grau em mais de 20% da superfície corporal |
| Embolia Gasosa | Surdez súbita | Doenças oftálmicas isquémicas agudas |
| | Neuroblastoma Estádio IV | Feridas seleccionadas de difícil cicatrização secundária a processos inflamatórios |
| | Úlcera Isquémica | <i>Pneumatois</i> <i>Cystoides</i> <i>Intestinalis</i> |
| | Osteomielite Crónica Refratária | |

Neste sentido, OTH é indicada como tratamento principal ou adjuvante em diversas doenças agudas ou crónicas de natureza isquémica, infecciosa, traumática ou inflamatória, que são geralmente graves e não respondem ao tratamento convencional (Pinto *et al.*, 2003)

2.2.1.3 Efeitos indesejáveis

Geralmente a terapia hiperbárica é um procedimento seguro quando utilizada de acordo com protocolos padrão supracitados. Contudo, à semelhança de outras terapias, a OTH não é uma terapia ausente de efeitos adversos (Tibbles and Edelsberg, 1996).

A variação da pressão poderá provocar lesões barotraumáticas. A lesão timpânica é a lesão mais frequente (Heyneman and Lawless-Liday, 2002; Sahni *et al.*, 2004).

Sabe-se ainda que muitas lesões induzidas pela hipéroxia são devidas a um excesso de radicais livres provenientes do O₂ que provocam stresse oxidativo e que este gás pode causar toxicidade em todos os órgãos do organismo humano. Contudo, apenas as lesões cerebrais, as pulmonares e as retianas assumem expressão clínica (Wu and Lieber, 2001; Sousa, 2007). Adicionalmente, quando se alcança uma pressão parcial de O₂ (pO₂) excessivamente elevada podem surgir sinais de irritação cortical que se manifestam em forma de crise convulsiva, como descreveu Paul Bert em 1878 (Sousa, 2007).

A toxicidade pulmonar do oxigénio, originalmente designadamente por efeito Lorrain – Smith, manifesta-se pelo aparecimento de sintomas irritativos do trato respiratório. Inicialmente surgem sinais e sintomas de traqueobronquite (transitórios com o cessar da exposição) e que, com a exposição continuada, evolui para um quadro de edema pulmonar agudo do tipo inflamatório e, finalmente para fibrose pulmonar intersticial (Fernandes, 2009). A toxicidade respiratória do oxigénio foi acidentalmente descoberta por James Lorrain Smith quando este submeteu um rato a exposição continua a pressões parciais de oxigénio variando entre 0.47 e 3.6 bar e verificou um quadro de insuficiência respiratória progressiva (Sousa, 2011).

Durante a sessão de OTH alguns doentes podem sofrer transtorno visual conhecido por miopia hiperbárica, embora este efeito regrida após a sessão. No caso de doentes com cataratas este tratamento pode contribuir para a sua evolução (Fernandes, 2009).

Não obstante, medidas preventivas podem ser adotadas de modo a reduzir estes efeitos indesejáveis. Por exemplo, a formação excessiva de radicais livres devido ao stresse oxidativo e conseqüentemente a manifestação das lesões com expressão clínica, pode ser evitada na maioria dos tecidos, com a inalação de ar durante 5 min a cada 30 min de sessão OTH (Leach *et al.*, 1998). Além disso, o adequado suporte nutricional e a ingestão de antioxidantes como a vitamina E podem ajudar na diminuição da sensibilidade ao stresse oxidativo (Edwards, 2010).

Em conclusão, algumas situações associadas à OTH requerem planeamento cuidadoso e, como em todas as modalidades terapêuticas, a avaliação da relação risco/benefício. No entanto, e apesar da OTH não ser uma terapia inócua de efeitos indesejáveis, a ocorrência destes efeitos é rara pelo que se trata de uma modalidade segura (Desola, 1998).

2.2.1.4 Física da OTH

A física da OTH rege-se pela lei dos gases ideais. Basicamente duas leis da física e alguns processos bioquímicos explicam os mecanismos de ação desta terapia (Gill and Bell, 2004).

A lei Dalton estabelece que a pressão total da mistura de um gás é igual à soma das pressões parciais de cada gás individual. Assim, depreende-se que a pressão total da mistura de gás é diretamente proporcional à pressão parcial de cada gás da mistura, isto é, se a pressão total da mistura gasosa aumentar, também aumenta a pressão parcial de cada gás envolvido nessa mistura (Khandelwal and Kaide, 2010).

A lei de Henry diz-nos que a pressão parcial de um gás dissolvido num líquido é proporcional à pressão exercida nesse gás (Gill and Bell, 2004). A OTH aumenta a pO_2 (tabela 2), ou também designada por pressão de O_2 arterial, e conseqüentemente provoca o aumento da quantidade de oxigénio dissolvido no sangue. Por exemplo, num paciente em ambiente normóxico normobárico (21% O_2 , 1 bar) cuja pO_2 ronda os 0,146 bar, a pO_2 aumenta para 0,43 bar, duas vezes mais que o valor de pO_2 a 1 bar, quando o paciente se encontra em ambiente normóxico hiperbárico (2 bar, 21% O_2). Embora a percentagem de O_2 continue a ser 21%, o paciente inala o dobro das moléculas de O_2 a cada inspiração (Khandelwal and Kaide, 2010).

A porção de O₂ no sangue é o somatório do O₂ transportado pela hemoglobina e o O₂ dissolvido no plasma. Em condições normobáricas, o O₂ dissolvido no plasma representa apenas 0,3 mL do O₂ total por 100 mL no sangue, comparando com os 19% transportados pela hemoglobina (Sahni *et al.*, 2004). Com a inalação de O₂ a 100% a 3 bar, o oxigénio não só satura a hemoglobina como se dissolve no plasma para níveis aproximadamente de 6% (60 mL de O₂/100 mL) e provoca o aumento da pO₂ para 6,7 bar (Sousa, 2007). Este mecanismo de ação permite o fornecimento suficiente de oxigénio para manter as funções metabólicas basais na ausência completa de hemoglobina, no caso de pacientes com anemia (Gill and Bell, 2004).

Além disso, o O₂ livre dissolvido em quantidades mais significativas no plasma sanguíneo consegue difundir-se para locais que são inacessíveis às moléculas de O₂ quando transportadas pela hemoglobina (Gill and Bell, 2004).

Segundo a lei de Boyle, o volume de um gás dentro de um espaço fechado é inversamente proporcional à pressão exercida, a temperatura constante, isto é, se a pressão aumenta, o volume diminui e vice-versa. Este princípio é importante na explicação de doenças como a DD e embolismo arterial gasoso (Wu and Lieber, 2001). Mediante o aumento da pressão o volume das bolhas de gás patogénicas diminui (Sousa, 2007).

Tabela 2: Quantidade de O₂ dissolvido no plasma (Adaptado de: Sahni *et al.*, 2004)

| Pressão Total bar | Quantidade de O ₂ dissolvido (% v/v) no plasma | |
|-------------------------|--|---------------------|
| | Ar (21% O ₂) | 100% O ₂ |
| 1 | 0,32 | 2,09 |
| 1,5 | 0,61 | 3,26 |
| 2 | 0,81 | 4,44 |
| 2,5 | 1,06 | 5,2 |
| 3 | 1,31 | 6,8 |

2.2.1.5 Princípios fisiológicos

Em ambiente hiperóxico hiperbárico o efeito da pressão, e conseqüentemente as alterações na solubilidade e nas características de difusão dos gases, despoleta uma série de efeitos fisiológicos no organismo humano. Estes efeitos estão diretamente relacionados com o aumento da pO_2 e com as forças mecânicas de pressão (Wu and Lieber, 2001) e incluem a redução intravascular e tecidual de bolhas de gás, a hiperoxigenação, a vasoconstrição, o aumento da atividade antimicrobiana e a angiogênese (Edwards, 2010a e 2010b).

Por exemplo, a hiperoxigenação, o aumento da disponibilidade de O_2 , estimula a formação de matriz de colagénio, essencial para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e cicatrização (Leach *et al.*, 1998). Para além de aumentar a disponibilidade de O_2 nos tecidos causa também vasoconstrição hiperóxica, que por sua vez reduz o edema e inchaço dos tecidos ao mesmo tempo que garante a entrega de oxigénio, sendo portanto, útil no tratamento de feridas traumáticas agudas e queimaduras (Khandelwal and Kaide, 2010). O papel fundamental do oxigénio na fisiologia da cicatrização de feridas está bem documentado (Hunt *et al.*, 1975).

Por outro lado, o aumento da atividade antimicrobiana é também um dos efeitos produzidos por esta terapia. A OTH aumenta a capacidade fagocitária e lise ao nível dos granulócitos polimorfonucleares neutrófilos, e subseqüentemente produz efeitos positivos no combate à infeção local (Tsuneyoshi *et al.*, 2001). Um estudo clínico conduzido por Topa e seus colaboradores (2007) demonstrou que a OTH estimula a atividade dos neutrófilos em pacientes diabéticos com lesões no pé quando aplicada em conjunto com as terapias convencionais (terapia insulínica intensiva, antimicrobianos e desbridamento cirúrgico). Adicionalmente, a OTH, devido às alterações fisiológicas e bioquímicas provocadas pelo ambiente hiperóxico (Khandelwal and Kaide, 2010), produz um efeito bactericida (organismos anaeróbios) e bacteriostático sobre vários organismos infecciosos (Edwards, 2010a).

Além disso, esta terapia demonstrou sinergismo com alguns antibióticos - aminoglicosídeos e quinolonas (Sahni *et al.*, 2004) trimetoprim, sulfametoxazol e sulfisoxazole (Khandelwal and Kaide, 2010)

Perante os efeitos fisiológicos supracitados, é perceptível que a OTH, através dos seus mecanismos, pode ser útil no tratamento de situações que cursam com hipóxia tecidual e celular (Sousa, 2007).

2.2.1.6 Efeito sobre microrganismos

Como anteriormente foi referido a OTH desempenha um papel antimicrobiano importante no combate a diversas infeções bacterianas. Das indicações terapêuticas para OTH destacam-se a osteomielite, a GG, infeções necrotizantes de partes moles (não clostridiais) e lesões no pé diabético como sendo as patologias associadas a microrganismos. Por exemplo, a GG é provocada pela família das *Clostridiaceae* (Hart and Strauss, 1990) enquanto que a osteomielite (Hamblen, 1968) e as lesões do pé diabético (Lipsky, 2004) são frequentemente associadas a *Staphylococcus*.

A hipóxia predispõe os tecidos à infeção uma vez que a capacidade fagocítica dos neutrófilos polimorfonucleares neste meio está comprometida. No entanto, a OTH reverte a hipóxia tecidual e celular, restaurando esta defesa orgânica e aumenta a capacidade fagocítica sobre algumas bactérias (Tibbles and Edelsberg, 1996; Wu and Lieber, 2001).

As bactérias são classificadas em termos da necessidade de pO_2 na qual crescem. Por definição, as bactérias anaeróbias não sobrevivem em ambiente com tensões normais de O_2 , devido à falta de defesas antioxidantes (Widiyanti, 2011). Pelo contrário, as bactérias aeróbicas possuem níveis elevados de antioxidantes endógenos e este tipo de bactérias são geralmente reportadas como resistentes à hiperóxia (Tsuneyoshi *et al.*, 2001).

Durante a OTH ocorre o aumento da produção de espécies reativas de O_2 , nomeadamente superóxido, peróxido de hidrogénio e outros radicais de oxigénio (figura 5) devido ao aumento da tensão de O_2 . Especificamente, nas infeções provocadas por bactérias anaeróbias, como é o caso da GG, estas bactérias são extremamente sensíveis aos radicais de O_2 produzidos pelo efeito da OTH. Este acontecimento deve-se ao facto da maioria destas bactérias não possuírem a enzima responsável pela degradação do superóxido, a superóxido dismutase (SOD), e a enzima que degrada o peróxido de hidrogénio, a catalase. Assim, o aumento da tensão de O_2 e subsequente formação de

radicais de O₂ é letal para a maioria dos microrganismos estritamente anaeróbios (Mader and Wilson, 1981).

A bactéria *Clostridium* é anaeróbia e a sua replicação, migração e produção de toxinas pode ser inibida pela exposição a altas concentrações de oxigénio. Em particular, a OTH a 3 bar durante 18 h tem um efeito bactericida sob a *Clostridium perfringens in vitro* e a produção da toxina α produzida por esta espécie é inibida. No entanto, foram observadas diferenças na suscetibilidade da espécie *Clostridium* à OTH (Widiyanti, 2011). Por exemplo, espécies como *Clostridium novyi*, *Clostridium histolyticum*, e *Clostridium tetani* são sensíveis ao O₂ mas *Clostridium bifermentans* e *Clostridium septicum* revelaram ser mais resistentes (Hill and Osterhout, 1972). No entanto, é sabido que *in vitro* a OTH pode ter um efeito bactericida em algumas espécies a 3 bar, enquanto que *in vivo* nas mesmas condições se verifica um efeito bacteriostático. Esta diferença deve-se à presença da enzima catalase nos músculos e sangue, que por sua vez é utilizada por *Clostridium* para inativar o peróxido de hidrogénio. No entanto, neste tipo de infeções clostridiais a cirurgia complementa os efeitos da OTH, na medida em que remove o tecido necrótico e as células vermelhas do sangue que podem libertar catalase (Hart and Strauss, 1990).

Vários estudos realizados *in vivo* ao longo das últimas décadas verificaram que a combinação da cirurgia, antibioterapia e a OTH aumenta a taxa de sobrevivência dos pacientes com infeções clostridiais quando comparada com a cirurgia e antibioterapia ou com antibioterapia e OTH. Contudo, verificou-se também que não houve sobrevivência quando apenas foi aplicada a OTH sem qualquer outra terapia (Wu and Lieber, 2001).

Por outro lado, as bactérias aeróbias apresentam uma resposta bifásica à OTH. Quando submetidas a pressões entre 0.6 e 1.3 bar, o seu crescimento é estimulado. Valores acima de 1,3 bar, o crescimento é inibido. O crescimento *in vitro* da *Escherichia coli*, por exemplo, é estimulado quando se aplica O₂ puro até 1 bar, e inibido acima de 2 bar. Em meio hiperóxico *in vitro* também se verifica o aumento do crescimento da *P. aeruginosa*, a 1 bar e da *C. diphtheriae*, de 0.2 a 0.87 bar quando comparado com o crescimento em ambiente normóxico (Widiyanti, 2011). Contudo, a sensibilidade dos microrganismos ao O₂ é dependente do tempo e da intensidade de exposição da espécie e da estirpe (Bornside *et al.*, 1975).

Vários autores relataram os efeitos da OTH em microrganismos aeróbicos *in vitro* e *in vivo* (Irvin *et al.*, 1966; Gottlieb, 1971), e no caso particular de *P. aeruginosa*, Irvin e os seus colegas (1966) verificaram que a OTH contínua a 2 bar durante 72 h produz um efeito bacteriostático sobre esta espécie, contudo alterações na morfologia destas colónias não foram observadas nestas condições. Adicionalmente, Clark e Pakman (1971) verificaram uma evidente alteração na morfologia da área nuclear e citoplasmática das células bacterianas *P. aeruginosa* expostas a 3 bar de pressão. Por sua vez, Bornside e os seus colaboradores (1975) demonstraram que a OTH a 3 bar durante 24 h apresenta um efeito bactericida sob *P. aeruginosa*.

Bornside e os seus colaboradores (1975) verificaram num estudo *in vitro* que o crescimento de *E. coli* é inibido após a exposição a OTH a 3 bar durante 24 h, o que é concordante com aquilo que acima foi referido. Além dos microrganismos acima mencionados, a exposição prolongada à OTH *in vitro* é bacteriostática para as seguintes bactérias entéricas: *Salmonella thyposa*, *S. chottmuelleri*, *S. paratyph*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, e *Proteus vulgaris* (Bornside *et al.*, 1975).

É de salientar que geralmente a OTH apenas consegue provocar efeitos bacterioestáticos ou bactericidas quando as pressões e ou/as durações do tratamento são superiores às que podem ser utilizadas clinicamente e acima referidas (ponto 2.2.1.1). Em laboratório será viável que O₂ hiperbárico seja bactericida quando usado isoladamente, uma vez que podem ser aplicadas pressões bastante elevadas e tempos de exposição prolongados (Widiyanti, 2011).

Adicionalmente, uma série de estudos sugeriram que a suscetibilidade das bactérias a antibióticos é afetada pela exposição a ambiente hiperbárico (Hind and Attwell, 1996). Vários autores relataram que a OTH aumenta o transporte e a eficácia dos antibióticos (Chen *et al.*, 2003), detetando assim sinergismo entre o O₂ e diversas drogas. Por exemplo, o estudo da interação de *polymycin B* com 2 bar de pressão de 100 % de O₂ demonstrou que esta interação prolongava a sobrevivência de ratinhos infetadas intraperitonealmente por *P. aeruginosa* (Gottlieb, 1971). Além disso, estudos *in vitro* com *P. aeruginosa* demonstraram que atividade inibitória da streptomina e da canamicina era também melhorada pela pO₂ (Pakman, 1971). Por outro lado o efeito sinérgico entre o O₂ e outros agentes antimicrobianos em vários microrganismos, como por exemplo, a penicilina, viomicina e eritromicina, não foi observado (Gottlieb, 1971).

A hiperóxia foi também relatada como potenciadora da atividade bacteriostática de nitrofurantoína e trimetoprim contra *E. coli* (Park *et al.*, 1991).

Consequentemente, a OTH deve ser utilizada concomitantemente à antibioterapia quando utilizada para combater infeções microbianas, pelo facto de esta terapia potencializar a atividade de alguns antibióticos.

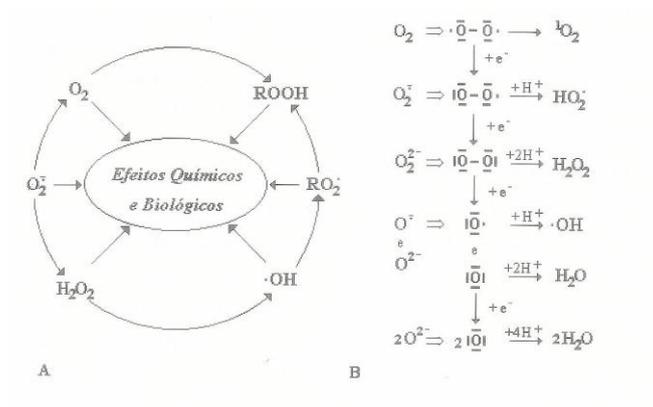


Figura 5: Imagem ilustrativa das espécies reativas de O_2 . A- Interconvenção das espécies reativas de oxigênio nos sistemas químicos e Biológicos. B- Activação da molécula de O_2 (Pinheiro, 2004).

2.3 Aplicação do tratamento hiperbárico a infeções por *Staphylococci*

Ao longo deste documento foi exposto que a OTH é uma terapia usada em vários tipos de patologias e com resultados conhecidos e comprovados. Para este estudo em concreto torna-se importante fazer referência a alguns estudos realizados com esta terapêutica associada a infeções provocadas por *Staphylococcus* bem como a estudos realizados *in vitro*. A osteomielite, por exemplo, é uma das indicações terapêuticas para OTH e é uma infeção Comummente associada a *S. aureus* e biofilmes (Chen *et al.*, 2003). Estudos realizados relataram que a OTH tem um efeito bacteriostático em culturas estafilocócicas (*S. aureus*) cultivadas durante 18 h, em condições de hiperóxia hiperbárica (100% O_2 , 2 bar) (Mcallister *et al.*, 1963).

Além disso, no mesmo estudo foi observada a diminuição do tamanho das colónias de *S. aureus*, após a exposição a OTH a 2 bar, em comparação com o tratamento a pressão de ar a 2 bar. Por outro lado, resultados obtidos por um estudo de Hamblen (1968)

demonstraram que não se verificou qualquer efeito inibitório sobre o crescimento de *S. aureus* com exposição intermitente a O₂, sendo estes dados concordantes com estudos anteriores realizados também *in vitro* (Hamblen, 1968; Widiyanti, 2011).

Num estudo realizado por Wiseman et al. foram observadas diferenças relativamente ao efeito da OTH sobre o crescimento bacteriano em meio sólido e meio líquido. Estes autores relataram o aumento do crescimento de *S. aureus* a 3 bar em meio líquido e não conseguiram demonstrar qualquer efeito da OTH sobre a atividade de vários antibióticos (Bornside, 1967).

Tsuneyoshi *et al.* (2001) estudaram os efeitos da pO₂ no crescimento *in vitro* de estirpes de MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), MSSA (*Methicillin-sensitive S. aureus*) isoladas de pacientes com infeções. Estes autores relataram que uma exposição de 90 min a hiperóxia hiperbárica (100% O₂, 2 bar) produz uma redução significativa no crescimento de MRSA e MSSA. No entanto, o mesmo não se verificou nos estudos realizados em condições de normóxia hiperbárica (21% O₂, 2 bar) e de hiperóxia normobárica (100% O₂, 1 bar), visto que não foi observado qualquer efeito inibitório no crescimento de *S. aureus* nestas condições. Estes resultados são concordantes com os resultados de estudos realizados anteriormente por Irvin *et al.* (1967), nos quais uma exposição prolongada a normóxia hiperbárica (21% O₂, 2 bar, 6 h) não apresenta um efeito inibitório significativo no crescimento de *S. aureus*. Tsuneyoshi (2001) e os seus colaboradores sugeriram que a exposição a condições de hiperóxia hiperbárica com aplicabilidade clínica tem um efeito inibitório no crescimento desta espécie bacteriana, incluindo as espécies resistentes à meticilina.

Várias investigações foram realizadas em modelos animais por diversos autores. Irvin (1966) e os seus colaboradores relataram que a infeção por *S. aureus* em feridas de porquinhos da índia foi reduzida a 2 bar de pressão de O₂ durante 72 h, contudo a esta redução das feridas foi revertida aquando da sua exposição ao ar após o tratamento durante 42 h.

Mader *et al* (1980) compararam o efeito de quatro tratamentos em coelhos com osteomielite causada por *S. aureus*. Os tratamentos consistiram em aplicação de OTH (100% O₂, 2 bar), cefalotina, OTH e cefalotina, comparando com o controlo (ar, 1 bar). Os autores verificaram uma redução do número de células cultiváveis após qualquer

tratamento relativamente ao controlo. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre estes 3 grupos de tratamento.

Os autores concluíram que a OTH é sinérgica ou aditiva com este antibiótico, contudo já haviam relatado, num estudo anterior, que a OTH era tão eficaz como a cefalotina no tratamento desta patologia.

Mendel *et al.* (1999) realizaram um estudo semelhante ao acima referido, no qual estudaram também o tratamento de osteomielite causados pela mesma espécie bacteriana mas em ratos e testaram os mesmos tratamentos, diferindo apenas as condições de pressão de O₂ do tratamento com OTH (100% O₂, 3 bar) e o antibiótico utilizado, a cefazolina. Os tratamentos com OTH (100% O₂, 3 bar) e antibioterapia com cefazolina. Este estudo mostrou que o tratamento com OTH reduziu as unidades formadoras de colónias (CFU/mL) de $2,9 \times 10^6$ para $6,2 \times 10^5$ g⁻¹ no osso da tíbia. Por outro lado, a redução do número de células cultiváveis foi mais evidente no tratamento com a cefazolina, no qual foram obtidos $10,5 \times 10^4$ CFU g⁻¹ no osso tibial. No entanto, as alterações mais significativas verificaram-se com o tratamento com OTH combinado com o agente antibiótico, o número de colónias obtido foi de $2,7 \times 10^3$ CFU g⁻¹. Estes resultados demonstraram não só alguma eficácia da OTH no tratamento da osteomielite, como revelaram um efeito aditivo potencial com a combinação de um antibiótico.

Chen *et al.* (2003) avaliaram o efeito da OTH em pacientes com osteomielite crónica, onde uma vez mais *S. aureus* mostrou ser o agente infeccioso. Dos 14 doentes que foram expostos a OTH (100% O₂, 2,5 bar, 2 h) 11 foram tratados com sucesso. O efeito da OTH em humanos com osteomielite é sugerido pelo facto da OTH intensificar a resposta do hospedeiro a infeções, tornando o ambiente no interior do organismo mais favorável às células responsáveis pela defesa (leucócitos), angiogénese e reabsorção de tecido morto ou infetado. Outros estudos realizados em humanos reportaram igualmente o sucesso da OTH no tratamento de osteomielite crónica.

Paralelamente, o efeito da OTH na atividade de vários antibióticos demonstrou o aumento da atividade antibiótica da streptomomicina contra *S. aureus* durante a exposição a OTH a 3 bar e foi ainda relatado o efeito sinérgico entre o O₂ e a tetraciclina nas mesmas condições (3 bar, 100% O₂) na inibição do crescimento desta espécie. Em contrapartida, uma análise com penicilina sugeriu que, embora o crescimento bacteriano tenha sido inibido, os efeitos eram aditivos e não sinérgicos, visto que a concentração

mínima eficaz de penicilina não foi influenciada pela pressão parcial de O₂ (Gottlieb, 1971). Estes dados estão concordantes com os resultados obtidos por Bornside (1967) num estudo onde foi avaliado o efeito da OTH sobre a atividade de vários antibióticos *in vitro*. Além disso, Bornside (1967) demonstrou que a OTH também melhora a atividade de outros agentes antibacterianos que não antibióticos, como por exemplo o iodóforo.

É de salientar que até à data não são conhecidos na literatura estudos referentes ao tratamento hiperbárico de *S. epidermidis*.

Como foi exposto ao longo deste trabalho, a OTH é uma modalidade terapêutica que tem conquistado um crescente protagonismo no tratamento de várias situações médicas e cirúrgicas, agudas ou crónicas, como modalidade primária ou como adjuvante a outros tratamentos. Por outro lado, as infeções nosocomiais têm vindo assumir um papel importante nos cuidados de saúde, originando infeções difíceis de tratar. Por conseguinte, neste trabalho pretendeu-se avaliar o comportamento de *S. epidermidis* comumente associada a este tipo de infeções, sob condições hiperbáricas de ambiente hiperóxico hiperbárico e também sob condições hiperbáricas combinando um agente oxidante químico.

3 Material e métodos

3.1 Microrganismo

Neste trabalho foi utilizada a bactéria *S. epidermidis* com referência 9142 da coleção do Laboratório de Micrologia Aplicada, IBB- Institute for Biotechnology and Bioengineering, CEB -Centre of Biological Engineering - University of Minho (Gomes *et al.*, 2009) Optou-se pela *S. epidermidis* uma vez que é reconhecida como uma das principais causas de infeções nosocomiais associadas a dispositivos médicos implantáveis (Cerca *et al.*, 2005).

3.1.1 Meios de cultura

Neste trabalho os meios de cultura utilizados foram o *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Liofilchem diagnostic) e o *Tryptic Soy Agar* (TSA). O meio TSB foi preparado com uma concentração igual a 30 g/L com a seguinte composição (g/L): 17 de digestão pancreática de caseína, 5 de NaCl, 3 de peptona de farinha de soja, 2,5 de D-glucose e 2,5 de Na₂HPO₄. O TSA foi efetuado do mesmo modo que o TSB acrescentado 1,4% de Agar (*Fluka Analytical*). Os meios foram esterilizados numa autoclave a 121°C durante 20 minutos e armazenados à temperatura ambiente.

3.1.2 Condições de armazenamento e manutenção

O armazenamento da estirpe *S. epidermidis* foi realizado em TSB suplementado com 15% (p/v) de glicerol (Sigma) a -20°C, em tubos criogénicos (VIBAKSTORE).

Para a reativação celular, a estirpe foi repicada para TSA. Estas placas foram colocadas a incubar durante 24 h a 37°C. As colónias obtidas após o período de incubação foram mantidas a 4°C por um período não superior a 3 semanas.

De notar também que todas as operações envolvendo a manipulação microbiana foram realizadas numa câmara de fluxo laminar tipo II à exceção dos ensaios no biorreator hiperbárico (ver ponto 3.4).

3.1.3 Preparação da cultura e crescimento de *S. epidermidis*

A preparação da cultura consistiu em inocular as colónias crescidas em TSA (como descrito no ponto 3.2.1) em 200 mL de TSB, num *erlenmeyer* de 500 mL. De seguida incubou-se a 37°C, numa incubadora orbital (*Edmund Buhler GmbH, SM-30 control*) a 100 rpm durante aproximadamente 13 h.

Posteriormente as culturas bacterianas de *S. epidermidis*, foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 10 min a 20°C (*Sigma 4K15*). De seguida as células foram lavadas uma vez com NaCl (0,9%, p/v) (*Merck*) por centrifugação. O sedimento resultante foi posteriormente ressuspensão em 200 mL de tampão de fosfato - *phosphate buffered saline* (PBS) (*Sigma-Aldrich*). Esta suspensão foi depois distribuída em *erlenmeyers* de 250 mL (100 mL/*erlenmeyer*), para o carregamento da câmara hiperbárica (ver ponto 3.3.2) e para o ensaio controlo (1 bar) em *erlenmeyer* (ver ponto 3.4.4).

3.2 Ensaio *S. epidermidis* com peróxido de hidrogénio

Foram efetuados ensaios nos quais se adicionou à cultura de *S. epidermidis* diferentes concentrações de H₂O₂ (*Fluka*), de modo a encontrar-se a concentração mais adequada para os ensaios posteriores na câmara hiperbárica.

Estes ensaios consistiram na adição de várias concentrações de H₂O₂ [0,25%, 0,375%, 0,5%, 1%, 2% e 3% (v/v)] à suspensão bacteriana (obtida como descrito no ponto 3.1.3). Cada teste foi efetuado em duplicado. Tal como descrito no ponto 3.5.1 foi efetuado o método das unidades formadoras de colónias no início do ensaio (0 h) e ao fim de 3 h e 5 h de exposição.

Foram efetuados ensaios nos quais se adicionou à cultura de *S. epidermidis* diferentes concentrações de H₂O₂ (*Fluka*), de modo a encontrar-se a concentração mais adequada para os ensaios posteriores na câmara hiperbárica.

3.3 Câmara hiperbárica

Os ensaios para avaliação do efeito de pressão na estirpe foram efetuados na câmara Whitey (Pinheiro, 2004).

3.3.1 Características da câmara hiperbárica

A câmara hiperbárica é constituída por um cilindro (modelo 304L-HDF4-300cc da *Whitey*) feito em aço inox 304, com volume útil de 300 mL e permite operar até uma pressão de 150 bar (figura 6). Este cilindro encontra-se instalado num tabuleiro móvel e imerso num banho termostaticado (*Certomat®WR-B.Braun*) o que permite a regulação da temperatura e da agitação. Adicionalmente, a pressão no interior da câmara hiperbárica é fixada manualmente ajustando as válvulas do sistema de pressurização (figura 6, I).

A monitorização da pressão dentro da câmara hiperbárica foi efetuada através de um transdutor de pressão (modelo HD 9220, *Delta OHM*), que permite a visualização digital dos valores de pressão relativa. No sistema de pressurização estão também incorporados uma válvula anti-retorno (figura 6, VA) e um filtro de ar (figura 6) de 0,45 µm em aço inox (modelo SS-2TF-LE). Ambas as peças estão posicionadas na tubagem da entrada de gás, a qual pode estar ligada ao posto de ar comprimido, ou a uma garrafa de oxigénio puro, que debita no máximo 7 bar de pressão.

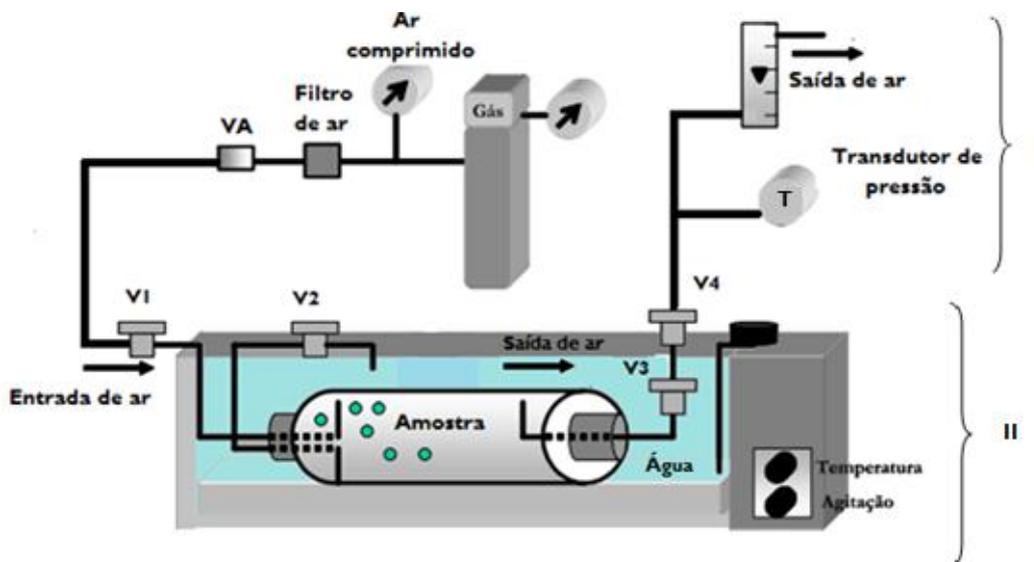


Figura 6: Esquema da instalação da câmara hiperbárica: I- sistema de pressurização, VA- válvula anti-retorno, V1, V4- válvulas tudo ou nada, V3- válvula de regulação, V2- válvula de amostragem. II- Câmara hiperbárica (adaptado de Pinheiro, 2004).



Figura 7: Fotografia da câmara hiperbárica Whitey de 0,3 L.

3.3.2 Condições de operação

Para o carregamento da câmara hiperbárica, esta foi inicialmente despressurizada através da abertura da válvula de saída de ar (figura 6, I -V4). Após o carregamento, efetuado através de uma bomba peristáltica (modelo MS-Reglo, Ismatec) a válvula de amostragem (figura 6, I -V2) foi fechada e as restantes (figura 6, I- V3,V4) foram manipuladas de forma a se obter o valor de pressão desejado (entre 1 e 6 bar) no interior da câmara hiperbárica. A agitação da câmara hiperbárica foi ajustada a 200 rpm e a temperatura foi regulada a 37°C (Pinheiro, 2004).

3.3.2.1 Amostragem

Durante os ensaios realizados na câmara hiperbárica retiraram-se amostras ao longo do tempo. A amostragem foi efetuada com a abertura da válvula de amostragem (figura 6, V2), recolhendo-se cerca de 1 mL de amostra, por ação da gravidade, para *ependorfs*. As condições de assepsia foram mantidas com o auxílio de um bico de bunsen.

3.3.3 Lavagem e desinfecção da câmara hiperbárica

A desinfecção da câmara hiperbárica foi efetuada *in situ*. Esta consistiu no carregamento de 200 mL de Betadine® (*Meda Pharma*) (diluída em H₂O na proporção 1:2), deixando-a no interior durante cerca de 18 h com agitação (200 rpm). De seguida, lavou-se a câmara hiperbárica quatro vezes com água destilada esterilizada (200 mL por lavagem), mantendo-se a agitação. No final de cada ensaio (ponto 3.4) após a remoção

da cultura, a câmara hiperbárica foi lavada duas vezes com água destilada (200 mL, 200 rpm), antes de uma nova desinfecção.

3.4 Ensaios na câmara hiperbárica

3.4.1 Efeito da pressão

Estes ensaios consistiram no carregamento da câmara hiperbárica (como descrito no ponto 3.3.2) com a suspensão bacteriana (obtida como descrito no ponto 3.1.3) e esta foi submetida a diferentes valores de pressão (1 a 5 bar), durante 5 h.

Imediatamente após o carregamento da suspensão bacteriana (0 h) e ao fim de 3 h e de 5 h de cada ensaio foram retiradas amostras do interior da câmara hiperbárica, pela saída de amostragem (figura 6, I- V2), como indicado no ponto 3.3.2.1 e efetuou-se o método de unidades formadoras de colónias (descrito no ponto 3.5.1).

3.4.2 Efeito de Oxigénio Puro (100%)

Foram também realizados ensaios com O₂ puro, nos quais a tubagem de entrada de gás da câmara hiperbárica foi ligada a uma garrafa de O₂ puro e após o carregamento da suspensão bacteriana foram realizados testes de pressão (1 bar a 5 bar) durante 5 h. Imediatamente após o carregamento da suspensão bacteriana e ao fim de 3 h e 5 h procedeu-se ao método das unidades formadoras de colónias (descrito no ponto 3.5.1).

3.4.3 Efeito da pressão conjugado com o agente químico - peróxido de hidrogénio

Estes ensaios, nos quais foram conjugados o efeito da pressão com um agente químico, consistiram primeiramente na adição de 1% de H₂O₂ à suspensão bacteriana. De seguida, carregou-se a câmara hiperbárica (como descrito no ponto 3.3.2) com a suspensão bacteriana (obtida como descrito no ponto 3.1.3) com o H₂O₂ e foram testados dois valores de pressão- 3 e 5 bar- durante 5 h. Tal como descrito no ponto 3.5.1. foi efetuado o método das unidades formadoras de colónias logo após o carregamento da suspensão bacteriana (0 h) e ao fim de 3 h e 5 h de exposição.

3.4.4 Ensaios Controlo

Paralelamente aos ensaios realizados no interior da câmara hiperbárica foram efetuados ensaios controlo. Estes ensaios consistiram na colocação de um *erlenmeyer* com 100 mL de suspensão bacteriana (obtida como descrito no ponto 3.1.3) no banho da câmara hiperbárica (figura 6, II), à pressão atmosférica e com as mesmas condições de agitação e temperatura aplicadas nos ensaios na câmara hiperbárica (como descrito no ponto 3.3.2). Tal como nos ensaios no interior da câmara hiperbárica, foram retiradas amostras às 0 h, 3 h, e 5 h e realizou-se o método das unidades formadoras de colónias (descrito no ponto 3.5.1).

3.5 Método analítico

3.5.1 Determinação da concentração celular- Método das unidades formadoras de colónias

De forma a avaliar a viabilidade celular de *S. epidermidis*, nos ensaios com tratamento hiperbárico e nos ensaios controlo, procedeu-se ao método das unidades formadoras de colónias (CFUs). Especificamente foram efetuadas várias diluições (10^{-1} a 10^{-6}) das diferentes amostras (retiradas do interior da câmara hiperbárica e respetivos controlos) e de seguida, procedeu-se ao plaqueamento, através da técnica da gota, de cada suspensão bacteriana diluída (quatro gotas de 10 μ L por diluição) na superfície da placa de TSA. Por fim, inclinaram-se as placas para as gotas escorrerem até à sua secagem completa e estas foram incubadas a 37°C durante aproximadamente 24 h. Após incubação a contagem das unidades formadoras de colónias foi efetuada por contagem manual.

3.6 Análise estatística

Com o intuito de testar os resultados obtidos durante a execução do trabalho prático, estes foram avaliados estatisticamente. Optou-se por recorrer ao teste *OneWay ANOVA* para comparar o número de células viáveis nos diferentes tratamentos com um máximo de 5 h. Recorreu-se também à distribuição de *t* de *Student* para comparação das médias entre o tratamento realizado e o controlo. Os resultados experimentais que apresentaram as diferenças entre os pares de valores, com $p < 0,05$, foram considerados

estatisticamente significativos. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

A análise estatística foi realizada com o programa Graphpad Prism 3 para windows.

4 Resultados e discussão

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos no trabalho experimental, bem como a sua análise, interpretação e discussão.

Perante o problema da resistência aos antimicrobianos comumente utilizados (Otto, 2009), várias pesquisas sobre a resposta bacteriana a agentes antimicrobianos têm sido realizadas procurando-se novos produtos e novas terapêuticas que apresentem eficácia sobre os microrganismos. Neste trabalho optou-se por testar três tratamentos diferentes, nomeadamente o tratamento hiperbárico, a oxigenioterapia e o tratamento hiperbárico conjugado com um agente químico, em células planctónicas de *S. epidermidis* avaliando a sua eficácia na inativação desta bactéria. A escolha desta espécie bacteriana deveu-se ao facto desta ser atualmente reconhecida como um dos principais agentes infecciosos nosocomiais (Cerca *et al.*, 2005), como foi anteriormente referido, e também pelo facto de apesar de estudos prévios terem sugerido que o metabolismo de algumas bactérias aeróbias é afetado pelo tratamento com oxigénio hiperbárico (Tsuneyoshi *et al.*, 2001), o seu efeito na viabilidade de *S. epidermidis* continua desconhecido.

4.1 Suscetibilidade de *S. epidermidis* a pressão de ar

A viabilidade de *S. epidermidis* foi avaliada pelo método das CFUs imediatamente no início do ensaio (0 h) e após 3 h e 5 h de exposição ao agente (ar) a 3 bar e 5 bar. Apesar da avaliação da cuturabilidade pelo método CFUs ser moroso, este é um método preciso na avaliação da eficácia de agentes antimicrobianos (Putman *et al.*, 2005). É de salientar que através dos resultados provenientes deste método é possível avaliar o efeito de diferentes agentes sobre as espécies bacterianas, sendo considerado bactericida para uma redução superior a 3 Log₁₀ CFU/mL ou 99% de morte celular e bacteriostático para reduções inferiores aos valores referidos (May *et al.*, 2000).

Paralelamente aos ensaios em que se aplicaram estes tratamentos, foram também realizados ensaios controlo, sem aplicação de qualquer tratamento. O efeito da pressão de ar a 3 bar e 5 bar no comportamento desta bactéria encontra-se apresentado nas figuras 7 e 8, respetivamente.

De acordo com a figura 8, o ar pressurizado a 3 bar não tem qualquer efeito na viabilidade das células de *S. epidermidis* até às 3 h de exposição, na medida em que o número de células cultiváveis do ensaio com tratamento não é estatisticamente diferente do obtido no ensaio controlo ($p > 0,05$). Neste estudo foram também testados valores de pressão de 2 bar de ar, mas optou-se por não apresentar os resultados destes ensaios, uma vez que estes não diferiam dos obtidos à pressão de 3 bar de ar até às 3 h de exposição. Estes resultados são semelhantes aos resultados obtidos por *Tsuneyoshi et al.* (2001) em *S. aureus*, em que não se verificaram efeitos inibitórios no crescimento desta espécie bacteriana após tratamento com pressão de ar a 2 bar durante breve exposição (90 min). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que exposições a pressões próximas da atmosférica (2-3 bar) até 3 h não interferem na suscetibilidade de *S. epidermidis*. Isto pode ser devido ao facto das células não apresentarem uma morte imediata após o aumento da pO_2 . Normalmente as células viáveis encontram-se viáveis após prolongada exposição a pO_2 elevadas embora o tempo durante o qual persistem viáveis esteja relacionado com a espécie e o valor da pressão (Pinheiro, 2004).

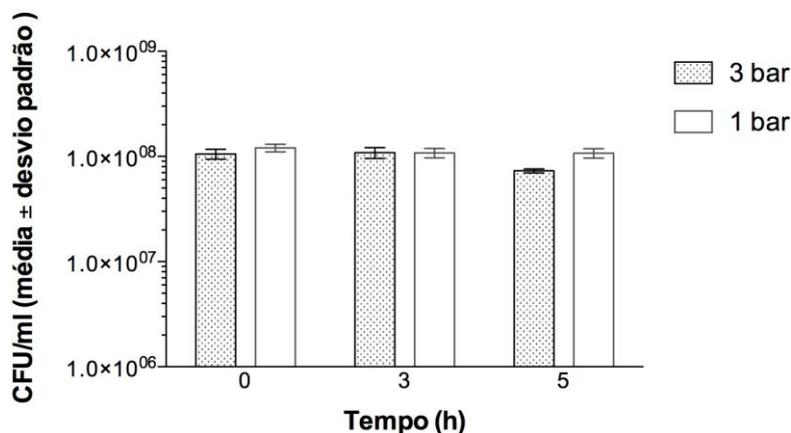


Figura 8: Suscetibilidade de *S. epidermidis* pressurizada com ar a 3 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar.

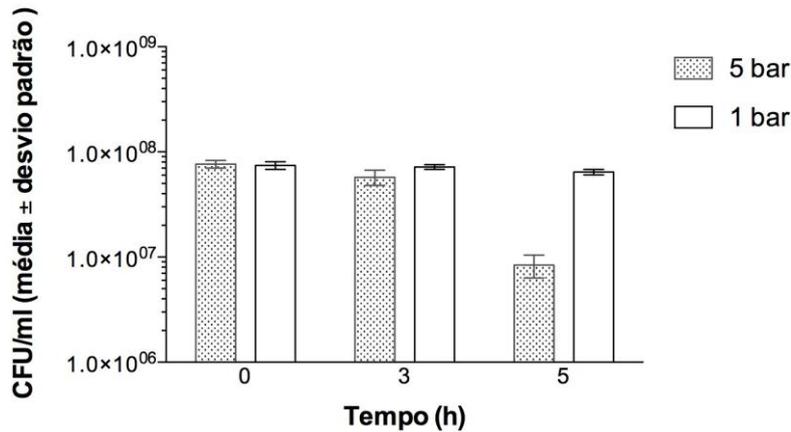


Figura 9: Suscetibilidade de *S. epidermidis* pressurizada com ar a 5 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar.

Pelo contrário, a viabilidade de *S. epidermidis* é afetada após a exposição a 3 bar durante 5 h uma vez que o número de células viáveis ($1,1 \times 10^8$ CFU/mL) diminuiu significativamente em relação ao número inicial de células ($7,3 \times 10^7$ CFU/mL) e ao número de células viáveis no ensaio controlo ($1,1 \times 10^8$ CFU/mL) com o mesmo tempo de exposição (figura 8). Estes resultados revelam que a pressão de 3 bar tem um efeito bacteriostático em *S. epidermidis* a partir das 3 h de exposição.

No entanto, nem todas as espécies bacterianas reagem à pressão da mesma forma. Por exemplo, um estudo, no qual foi avaliado o efeito da pressão de ar a 2 bar em *S. aureus* durante 6 h, demonstrou que exposições prolongadas a essa pressão não produzem um efeito inibitório significativo no crescimento desta bactéria (Irvin *et al.*, 1967). O que está de acordo com o que já anteriormente foi dito, no que diz respeito ao facto do efeito da pressão de um gás sobre as células estar dependente do valor de pressão e do tipo de espécie submetida ao agente.

Relativamente ao ensaio realizado a pressão de ar de 5 bar (figura 9), verifica-se que o efeito da pressão na viabilidade de *S. epidermidis* é semelhante ao observado a pressão de ar de 3 bar (figura 8), embora se tenha observado um decréscimo de viabilidade mais acentuado às 5 h. À semelhança do ensaio a pressão de ar de 3 bar, nas condições a pressão de ar de 5 bar também não se verificou a redução no número de células viáveis durante a exposição de 3 h comparando com o número de células viáveis observadas no início ($t=0$ h) ($p>0,05$).

Por outro lado, após uma exposição durante 5 h a 5 bar (figura 9), foi possível observar uma redução cerca de 1 log₁₀ no número de células cultiváveis entre o tempo inicial (7,6x10⁷ CFU/mL) e às 5 h (8,4x10⁶ CFU/mL), bem como entre o ensaio com tratamento e ensaio controlo (6,4x10⁷ CFU/mL) às 5 h. Desta forma, pode-se verificar que o tratamento durante 5 h a 5 bar (figura 9) é mais eficaz na redução da viabilidade celular de *S. epidermidis* do que o tratamento a 3 bar (figura 8). Segundo estes resultados verifica-se que o efeito sobre as células bacterianas é mais acentuado com o aumento da pressão, apesar de ser bacteriostático.

A redução da suscetibilidade de *S. epidermidis* observada em ambos os ensaios realizados pode estar relacionada com o facto de a pressão ser diretamente proporcional à pO₂. Desta forma, como foi anteriormente referido, o aumento da pO₂ e subsequente aumento das espécies reativas de O₂ provocam o aumento do stresse oxidativo. Num estudo realizado por Aiassa et al. (2012) em que foram realizados ensaios de quimioluminescência foi mostrado que *S. epidermidis* em condições planctónicas produz uma quantidade detetável de espécies reativas de O₂ na presença de um agente oxidante. Estes autores mostraram também que a capacidade de formação de biofilme por esta espécie bacteriana diminui devido à presença do agente oxidante e que este benefício está associado ao aumento da produção das espécies reativas de O₂ nas células planctónicas. Atendendo a esta evidência pode-se assumir que valores elevados de espécies reativas de O₂ atuam negativamente nas células de *S. epidermidis*.

É sabido que os microrganismos aeróbios em geral têm a capacidade de desenvolver resistência ao stresse oxidativo, provocado pelo aumento das espécies reativas de O₂, devido à indução e libertação de enzimas antioxidantes intracelulares, nomeadamente a SOD, a catalase (Lawless-Liday) e glutathione reductase (GR) (Tsuneyoshi *et al.*, 2001; Pinheiro, 2004). Estas enzimas assumem um papel muito importantes na defesa dos aeróbios contra as espécies reativas de O₂. De acordo com esta informação, a tolerância verificada de *S. epidermidis* ao agente oxidante, nos tratamentos a 3 e 5 bar durante as 3 h de exposição, pode estar associada à indução e libertação destas enzimas. Em contrapartida, a exposição prolongada das células até às 5 h poderá ter levado a um desequilíbrio entre os níveis de espécies reactivas geradas e os níveis de enzimas antioxidantes, entre outros mecanismos de defesa (Moradas Ferreira *et al.*, 1996).

4.2 Suscetibilidade das células de *S. epidermidis* a pressão de oxigénio puro

As células de *S. epidermidis* foram submetidas a várias pressões (1, 2, 3 e 5 bar) de O₂ puro, contudo são apenas apresentados os resultados dos ensaios efetuados a pressões de O₂ de 3 bar e 5 bar, visto que os resultados obtidos nos ensaios a 1 e 2 bar não mostraram alterações no número de células viáveis de *S. epidermidis*, e a pressão de ar de 1 bar (controlo) desde o início dos ensaios.

Pela análise destes resultados (figura 10) pode-se verificar que o tratamento com 100% de O₂ a 3 bar apresenta alterações no número de células ao longo das 5 h de exposição, pelo que se pode observar uma redução do número de células viáveis do ensaio com O₂ puro a 3 bar no início (t=0 h) ($6,7 \times 10^7$ CFU/mL) comparando com o número de células viáveis do mesmo ensaio após a exposição a 5 h ($6,5 \times 10^6$ CFU/mL) ($p < 0,05$). Contudo, pode-se também observar uma diminuição estatisticamente significativa do número de células viáveis no ensaio controlo entre as 0 e as 3 h. A redução do número das células de *S. epidermidis* neste ensaio não era esperada, uma vez que se trata do ensaio controlo no qual *S. epidermidis* não foi sujeita a qualquer agente antimicrobiano. No entanto, a diferença observada no número de células no ensaio de pressão de O₂ puro de 3 bar é maior do que a observada nos ensaios controlo. Pelo contrário, não se verificaram diferenças ($p > 0,05$) entre o número de células do ensaio controlo entre as 3 h e 5 h, o que sugere que a redução da viabilidade observada no ensaio com tratamento neste intervalo de tempo é devida ao efeito da pressão de O₂ dentro da câmara hiperbárica.

Estes resultados são concordantes com os obtidos por Tsuneyoshi *et al.* (2011), na medida em que estes autores verificaram que uma exposição a condições de hiperóxia hiperbárica (100 % O₂, 2 bar) produz um efeito inibitório no crescimento de *S. aureus*. Pelo contrário, neste estudo o mesmo não se verificou no que diz respeito a este tratamento em *E. coli*, confirmando uma vez mais aquilo que se referiu anteriormente relativamente ao facto do efeito de um agente oxidante estar dependente da espécie. Mesmo sendo um ensaio com pressão de O₂ diferente da pressão de O₂ utilizada neste presente estudo, estes resultados são concordantes com os do estudo referido, no sentido em que a pressão de O₂ apresenta um efeito bacteriostático em espécies bacterianas, nomeadamente *S. epidermidis* e *S. aureus*. Adicionalmente, verifica-se que a redução da

viabilidade celular de *S. epidermidis* é mais acentuada após as 3 h de exposição, observando-se uma redução cerca de 1 Log₁₀.

Os resultados deste tratamento (figura 10) demonstram ser mais eficazes na diminuição da suscetibilidade de *S. epidermidis* quando comparados com os resultados obtidos após a exposição a pressão de ar de 3 bar (figura 8). Esta evidência poderá estar relacionada com as elevadas concentrações de O₂ provocadas pelo tratamento de pressão de 100% de O₂. O aumento da pO₂ é mais evidente em ambiente de hiperóxia hiperbárica do que em ambiente hiperbárico. Por exemplo, em condições de pressão de ar 3 bar a pO₂ atinge valores de 0,64 bar, em contrapartida em ambiente de 100% O₂ a 3 bar aumenta a pressão parcial atinge cerca de 2,93 bar (Khandelwal and Kaide, 2010).

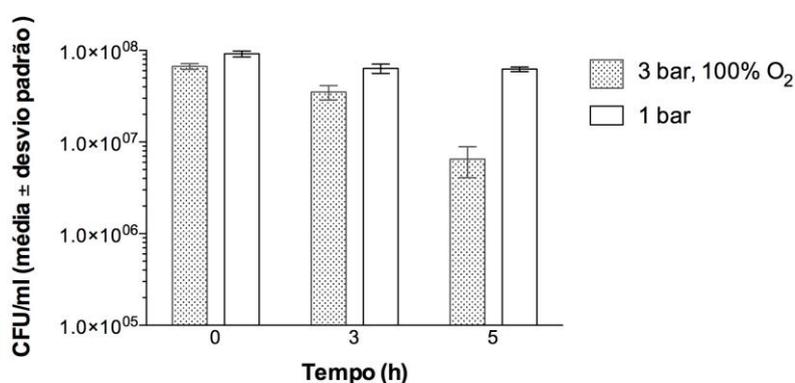


Figura 10: Suscetibilidade de *S. epidermidis* a O₂ pressurizado a 3 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar.

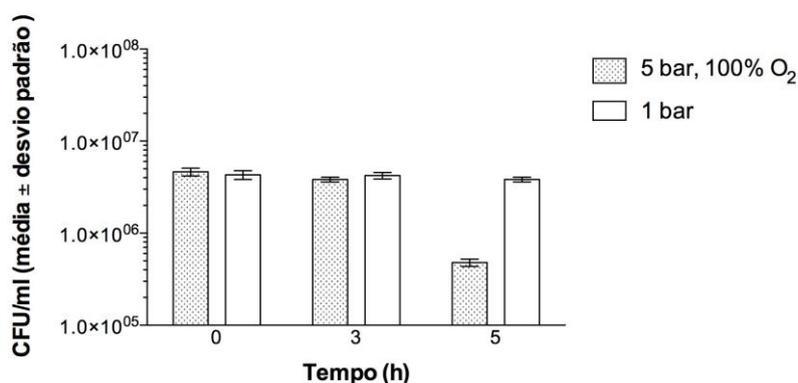


Figura 11: Suscetibilidade de *S. epidermidis* a O₂ pressurizado a 5 bar ao longo de 3 e 5 h. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar.

Os resultados apresentados na figura 11 sugerem que o tratamento com 100% de O₂ a 5 bar afeta a viabilidade celular de *S. epidermidis* apenas após as 3 h de exposição, uma vez que desde o início do tratamento até às 3 h não é verificada uma diminuição no número de células viáveis ($p > 0,05$). Contudo, às 5 h de exposição a este tratamento verifica-se uma redução de aproximadamente 1 log₁₀ na viabilidade de *S. epidermidis* ($p < 0,05$). Estes resultados demonstram que o efeito da pressão de O₂ a 5 bar (figura 11) é mais acentuado que o efeito observado no tratamento com pressão de ar a 5 bar (figura 9), uma vez que a diferença observada na redução do número de células viáveis às 5 h de exposição entre estes dois ensaios é superior no ensaio com pressão de O₂. Este facto sugere que neste caso a percentagem de O₂ atuou sinergicamente com a pressão. No entanto, atendendo aos resultados obtidos no ensaio a 3 bar com O₂ puro (figura 10) em que se verificou também este efeito sinérgico, seria expectável observar-se uma diminuição mais acentuada da viabilidade celular de *S. epidermidis* após a exposição a tratamento com pressão de O₂ de 5 bar.

Os resultados obtidos com a realização destes ensaios sugerem que a oxigenioterapia produz um efeito bacteriostático nesta espécie bacteriana. Este efeito é devido ao aumento dos valores de pO₂ e de oxigénio dissolvido, e subsequentemente ao aumento da produção de espécies reativas de O₂ e como foi supracitado, valores elevados destas espécies podem ser prejudiciais à actividade celular. Estes resultados (figura 10 e 11) são concordantes com os também obtidos por vários autores (McCallister *et al.*, 1963; Irvin *et al.*, 1966; Pennock, 1966; Gottlieb, 1971) que reportaram que a OTH produz um efeito inibitório na viabilidade celular de certos microrganismos aeróbicos *in vitro*. Estudos realizados por Pennock (1966) validam o facto que a OTH reduz o número de colónias bacterianas na superfície de meio sólido proporcionalmente com o aumento da pO₂.

Por outro lado, e apesar de neste trabalho ter sido verificado que nas condições experimentais testadas a pressão de O₂ puro produz apenas efeito bacteriostático na espécie *S. epidermidis*, estudos com pressão hidrostática elevada têm vindo a ser realizados pela sua capacidade em inativar bactérias. Por exemplo, um estudo realizado em que a bactéria *S. epidermidis* foi exposta a elevadas pressões de ar (1000 bar, 2500 bar, 4000 bar e 5400 bar) demonstrou que estas pressões elevadas produziam um efeito bactericida sobre esta espécie (Dommerich *et al.*, 2012).

Em contrapartida, é sabido que elevadas concentrações de O₂ produzem efeitos tóxicos em diversas formas de vida e esta toxicidade está claramente relacionada com a pO₂, bem como com o tempo de exposição (Brown and Huggett, 1968). Desta forma, e atendendo aos resultados obtidos, é necessário ter em atenção que as condições testadas neste trabalho, e para as quais foram observados efeitos significativos, não têm aplicabilidade terapêutica, uma vez que excedem a pressão e o tempo de exposição que são aconselháveis a fim de evitar a ocorrência dos efeitos tóxicos da hiperóxia (Sousa, 2007).

Apesar de este estudo demonstrar que *S. epidermidis*, *in vitro*, apresenta tolerância até às condições toleradas clinicamente (máximo 3 bar de O₂ puro, 120 min), isto não invalida o facto de esta terapêutica representar um benefício clínico no controlo deste tipo de infeções, quando as medidas de segurança adequadas são aplicadas. Tendo em atenção que os ensaios efetuados no presente estudo são realizados num modelo *in vitro*, o efeito da OTH sob esta espécie bacteriana *in vivo* poderá ser diferente devido aos acontecimentos fisiológicos que ocorrem no organismo humano durante a sessão de OTH. É sabido que as infeções, assim como várias condições patológicas, são caracterizadas pela diminuição da pressão parcial de O₂ nos tecidos (Widiyanti, 2011). A OTH por sua vez tem a capacidade de provocar um aumento dessa pressão e subsequentemente promover a produção de espécies reativas de O₂ que desencadeiam o aumento da capacidade fagocitária dos neutrófilos polimorfonucleares (Mader *et al.*, 1980). Além disso, a OTH promove também a produção de colagénio por fibroblastos e desta forma permite a cicatrização de feridas em locais hipóxicos (Leach *et al.*, 1998). Atendendo a isto, pode-se depreender que os efeitos fisiológicos causados pela OTH no organismo humano podem potenciar o efeito antimicrobiano desta terapêutica sobre *S. epidermidis* em modelo *in vivo*. Neste sentido, serão necessários mais estudos em que o comportamento desta bactéria seja avaliada *in vivo*, para que o tratamento de infeções associadas a *S. epidermidis* possa ser também indicado a OTH, assim como infeções associadas a outras bactérias são indicadas (Tibbles and Edelsberg, 1996).

4.3 Suscetibilidade das células de *S. epidermidis* ao efeito conjugado da pressão de ar com o peróxido de hidrogénio

4.3.1 Efeito de peróxido de hidrogénio em *S. epidermidis*

Estes ensaios consistiram no estudo da suscetibilidade de *S. epidermidis* a um agente oxidante químico, o peróxido de hidrogénio, com o objetivo de selecionar a concentração mais adequada para posteriormente se conjugar essa concentração com a pressão nos ensaios no interior da câmara de pressão. Para tal, foram testadas três concentrações de H₂O₂, nomeadamente 1%, 2% e 3% (v/v) durante 3 h.

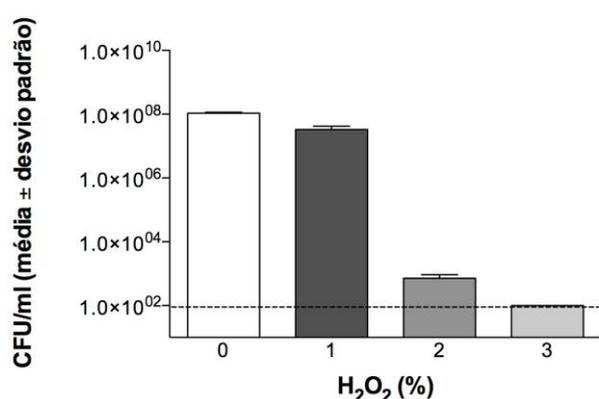


Figura 12: Suscetibilidade de *S. epidermidis* ao H₂O₂ às várias concentrações (1%, 2%, 3%). O controlo foi realizado sem adição de H₂O₂. O tracejado representa o limite de deteção do método analítico.

Como se pode verificar pela figura 12, a concentração de H₂O₂ a 2% e 3% é bactericida para esta espécie bacteriana, observando-se uma redução de 3 unidades logarítmicas na viabilidade de *S. epidermidis* a 2% e a morte celular a 3% de H₂O₂. Por outro lado a 1 % de H₂O₂ verifica-se um efeito bacteriostático, observando-se uma redução de 1 log₁₀ no número de células viáveis observadas no ensaio controlo para o ensaio a 1% de H₂O₂. Tendo em conta estes resultados, optou-se por selecionar esta última concentração de H₂O₂ para ser utilizada nos ensaios de conjugação de a pressão e H₂O₂.

4.3.2 Efeito conjugado da pressão de ar com peróxido de hidrogénio em *S. epidermidis*

Nestes ensaios foi estudado o efeito da pressão de ar na resposta ao stresse oxidativo causado pela exposição a um agente oxidante químico, o peróxido de hidrogénio, com concentração de 1% (v/v). Esta concentração de oxidante utilizada foi seleccionada tendo como base os ensaios realizados no ponto de 4.3.1. Nestes ensaios utilizaram-se várias concentrações de agente oxidante, H₂O₂, e a partir dos resultados obtidos nestes ensaios e tendo também como base um trabalho de outros autores (Chaieb *et al.*, 2011) foi seleccionada a maior concentração não letal.

Vários estudos realizados demonstraram que o H₂O₂ é comumente utilizado como desinfectante pela sua capacidade antibacteriana (Presterl *et al.*, 2007; Chaieb *et al.*, 2011). Desta forma, é expectável que esta atividade antimicrobiana seja também verificada no presente estudo.

Nas figuras 13 e 14 estão representados os resultados obtidos nos ensaios realizados com oxidante químico à pressão de ar a 3 bar e 5 bar, respetivamente.

Os resultados obtidos pelo tratamento com 1% de H₂O₂ a pressão de ar a 3 bar (figura 13) sugerem que estes ensaios não são concordantes com os resultados previstos. Quando se analisa o comportamento da viabilidade celular ao longo de 5 h de exposição a este tratamento, verifica-se o acréscimo estatisticamente significativo da viabilidade de *S. epidermidis*, tanto para os ensaios com tratamento como para os ensaios controlo. O expectável seria observar, pelo menos, um comportamento semelhante ao observado no ensaio de pressão de ar a 3 bar (figura 8), uma vez que o H₂O₂ é um agente oxidante e deste modo deveria produzir um decréscimo no número de células viáveis.

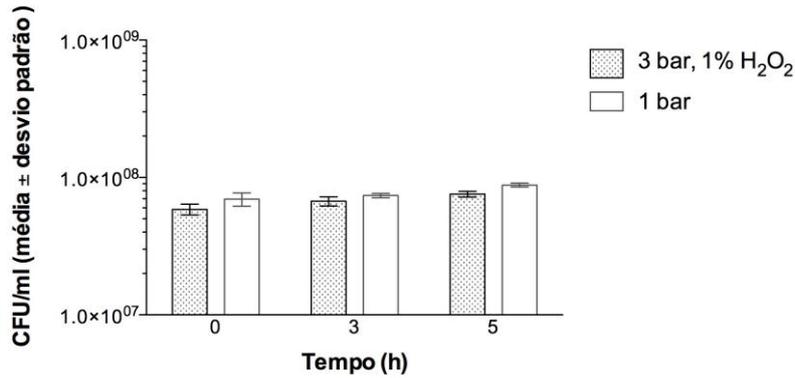


Figura 13: Suscetibilidade de *S. epidermidis* a 1% de H₂O₂ com pressão de ar a 3 bar ao longo de 3 e 5 h do tempo. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar.

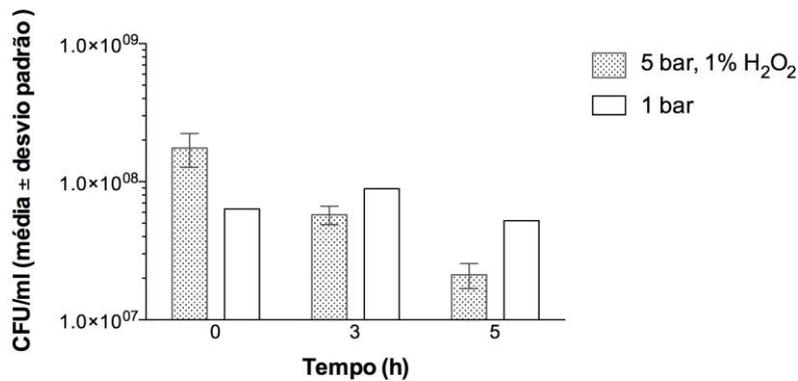


Figura 14: Suscetibilidade de *S. epidermidis* a 1% de H₂O₂ com pressão de ar a 5 bar ao longo de 3 e 5 h do tempo. O ensaio controlo foi efetuado a 1 bar de ar.

Por outro lado, a resposta de *S. epidermidis* ao tratamento com 1% de de H₂O₂ com pressão de ar a 5 bar (figura 14) revela um significativo efeito repressivo na viabilidade celular. De acordo com o gráfico representado na figura 13, podem-se observar diferenças no número de células viáveis ($p < 0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo. Especificamente, entre o tempo inicial e as 5 h de tratamento pode-se verificar uma redução de aproximadamente uma unidade na escala logarítmica. Em relação aos resultados do ensaio controlo estes também apresentam uma alteração estatisticamente significativa na viabilidade de *S. epidermidis*. Entre o tempo inicial ($t=0$ h) e as 3 h de exposição verifica-se um acréscimo da viabilidade celular ($p < 0,05$), pelo contrário no intervalo de tempo das 3 e 5 h verifica-se que o número de células viáveis diminuiu

significativamente. Contudo, no ensaio controlo o número de células no início não apresentam alterações ($p > 0,05$) relativamente ao número de células às 5 h de exposição, sendo que estes resultados demonstram que as alterações inibitórias no número das células viáveis é mais acentuado no ensaio dentro da câmara hiperbárica.

Os resultados deste ensaio (figura 14) são semelhantes aos obtidos com o tratamento em condições de pressão de ar a 5 bar (figura 9). Desta evidência depreende-se que *S. epidermidis* apresenta tolerância a esta concentração de H_2O_2 nas condições experimentalmente testadas, sendo que o agente oxidante químico tem um efeito sob *S. epidermidis* equiparável à pressão de ar.

Porém, tratando-se estes ensaios da combinação de dois agentes causadores de stresse oxidativo, e tendo em conta que a ação dos agentes antimicrobianos é influenciada pelas tensões de O_2 no meio (Park *et al.*, 1991), seria também esperada a demonstração de um efeito sinérgico entre o oxidante químico e o aumento da pressão e tal não foi verificado. Contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, vários estudos *in vitro* demonstraram que a atividade antibiótica poderia ser melhorada pelo aumento da pO_2 (Pakman, 1971) (Bornside, 1967). Estes resultados podem estar associados com o facto de o H_2O_2 quando exposto a luz solar ou a impurezas metálicas se decompor rapidamente formando oxigénio e água. Neste sentido, o material da câmara hiperbárica, aço inoxidável, pode ter sido o responsável pela autodecomposição do H_2O_2 e desta forma não foi observada a inativação de *S. epidermidis* esperada por este agente oxidante.

5 Conclusões e perspetivas futuras

Nesta seção apresentam-se as conclusões resultantes do trabalho experimental e mencionam-se ainda sugestões para futuros trabalhos.

Neste trabalho foi estudada a suscetibilidade de *S. epidermidis* ao stresse oxidativo causado por agentes físicos e químicos, nomeadamente a pressão de ar e de oxigénio e o peróxido de hidrogénio.

Foi demonstrado que as células de *S. epidermidis* são tolerantes às condições testadas de pressão de 3 bar e 5 bar até às 3 h de exposição. Pelo contrário, após esse tempo exposição foi observado um aumento da suscetibilidade celular desta bactéria em ambos os tratamentos. Observou-se ainda que o aumento da pressão de 3 bar para 5 bar produz um decréscimo mais acentuado no número de células viáveis de *S. epidermidis* do que o aumento de 1 bar para 3 bar. Desta forma conclui-se que valores mais elevados de pressão provocam uma situação mais adversa à célula desta bactéria. Esta alteração na suscetibilidade pode estar relacionada com o aumento da produção das espécies reativas de O₂ que afetam negativamente a atividade celular.

No que diz respeito aos resultados obtidos através dos ensaios com O₂ puro estes resultados confirmam que a pressão de O₂ causa uma situação de stresse oxidativo nas células de *S. epidermidis* que traduz-se na redução da sua viabilidade celular. Além disso, notou-se que tanto a pressão de 3 bar, como a de 5 bar aliada com o O₂ puro produzem um efeito sinérgico provocando uma redução mais acentuada no número de células viáveis comparando com a redução observada no ensaio de pressão de ar a 3 bar e 5 bar, respetivamente. Uma vez mais a redução do número de células viáveis observada nestas condições pode estar associada ao efeito causado pelo aumento da pressão parcial de O₂ e concentração de oxigénio no meio e subsequente indução das espécies reativas de O₂ e o efeito sinérgico é verificado devido ao facto do ambiente de hiperóxia hiperbárica promover um aumento da pressão parcial de O₂ mais evidente que no ambiente hiperbárico. Desta forma, é de salientar que não é o valor de pressão *per se* o principal agente de stresse oxidativo, mas sim o oxigénio.

Os resultados observados através do tratamento a pressão de ar de 3 bar aliada ao oxidante de peróxido de hidrogénio não teve qualquer efeito sobre a inibição de *S.*

epidermidis. No entanto, através do ensaio a pressão de ar de 5 bar pode-se observar que a suscetibilidade desta bactéria aumentou, embora não se tenha observado um efeito sinérgico entre a pressão de ar e o agente oxidante.

Com este conjunto de análises foi possível esclarecer o comportamento desta espécie bacteriana em condições de stresse oxidativo, causadas pelo aumento da pressão de ar e O₂ e pela exposição a peróxido de hidrogénio. Apesar deste trabalho demonstrar que a utilização do ar e O₂ hiperbárico até aos valores testados não constitui uma alternativa clinicamente viável de ser aplicada em doentes, estas técnicas podem ser utilizadas como um método alternativo para desinfeção de dispositivos médicos.

Porém, o trabalho realizado suscitou questões, cuja concretização do seu estudo não foi possível tendo em conta o tempo para a realização desta dissertação, que poderão ser estudadas em trabalhos futuros, salientando-se as seguintes sugestões:

- Avaliar o efeito da pressão de ar e de O₂ no crescimento de *S. epidermidis*. Um dos objetivos iniciais deste trabalho passou pela realização deste estudo, contudo o estudo tornou-se inviável devido ao facto de não ter sido observado qualquer crescimento desta espécie bacteriana no interior da câmara de aço inoxidável usada nos vários ensaios efetuados. Assim, a utilização de um sistema de outro material (ex: vidro resistente à pressão) permitiria esclarecer quanto a este efeito.
- Tendo em conta que este estudo foi efetuado em *S. epidermidis* em fase estacionária, seria interessante estudar o comportamento da mesma espécie bacteriana nas mesmas condições mas em fase exponencial, atendendo ao facto que as células nesta fase de crescimento são mais sensíveis os efeitos destrutivos dos diferentes fatores de stresse.
- Avaliar o efeito dos oxidantes na atividade das enzimas anti-oxidantes, por exemplo a SOD e a catalase.
- Avaliar a suscetibilidade de *S. epidermidis* a tratamento com pressão de O₂ conjugada com o H₂O₂ e outros agentes antimicrobianos, como por exemplo antibióticos.
- Avaliar a suscetibilidade de *S. epidermidis* em biofilmes desta espécie e comparar com os efeitos observados em células planctónicas.
- Alargar o estudo a outras espécies bacterianas associadas a infeções nosocomiais, nomeadamente *S. aureus*.

6 Referências Bibliográficas

- Aiassa, Barnes, et al. (2012). "In vitro oxidant effects of D-glucosamine reduce adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." Revista Argentina de Microbiologia **44**: 16-20.
- Bornside (1967). "Enhancement of antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* by exposure to hyperbaric oxygen." Applied Microbiology **15**: 1020-1024.
- Bornside, Pakman, et al. (1975). "Inhibition of pathogenic enteric bacteria by hyperbaric oxygen: enhanced antibacterial activity in the absence of carbon dioxide." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **7**: 682-687.
- Brennan, Walls, et al. (2009). "Tourniquets and exsanguinators: a potential source of infection in the orthopedic operating theater?" Acta Orthopaedica **80**: 251-255.
- Brown and Huggett (1968). "Effects of hyperoxia upon microorganisms." Applied Microbiology **16**: 476-479.
- Cerca, Martins, et al. (2005). "Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **56**: 331-336.
- Cerca, Pier, et al. (2005). "Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*." Research in Microbiology **56**: 506-514.
- Chaieb, Zmantar, et al. (2011). "XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." Microbial Pathogenesis **50**: 1-5.
- Chen, Shih, et al. (2003). "Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of chronic refractory osteomyelitis: a preliminary report." Chang Gung Medical Journal **26**: 114-120.
- Clark and Pakman (1971). "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by hyperbaric oxygen." Infection and Immunity **4**: 488-491.
- Cowan (1999). "Plant products as antimicrobial agents." Clinical Microbiology Reviews **12**: 564-582.
- Desola (1998). "Bases y fundamento terapeutico de la oxigenoterapia hiperbarica." JANO/Medicina **1260**: 5-11.
- Dommerich, Frickmann, et al. (2012). "Effects of high hydrostatic pressure on bacterial growth on human ossicles explanted from cholesteatoma patients." PLoS ONE **7**: e30150.
- Edwards (2010a). "Hyperbaric oxygen therapy. Part 1: history and principles." Journal of Veterinary Emergency and Critical Care **20**: 284-288.
- Edwards (2010b). "Hyperbaric oxygen therapy. Part 2: application in disease." Journal of Veterinary Emergency and Critical Care **20**: 289-297.
- Eiff, Heilmann, et al. (1998). "*Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful?" Clinical Microbiology and Infection **4**: 297-300.

- Eiff, Peters, et al. (2002). "Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci." The Lancet Infectious Diseases **2**: 677-685.
- Eiff, Proctor, et al. (2001). "Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections." Postgraduate Medicine **4**: 63-76.
- Fernandes (2009). "Medicina hiperbárica." Acta Medica Portuguesa **22**: 323-334.
- Gelape (2007). "Surgical wound infection following heart surgery." Arquivos Brasileiros de Cardiologia **89**: e3-e9.
- Gill and Bell (2004). "Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes." QJM **97**: 385-395.
- Goldmann and Pier (1993). "Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization." Clinical Microbiology Review **6**: 176-192.
- Gomes (2012). Género *Staphylococcus* spp. In: Compêndio da disciplina de Microbiologia Clínica Veterinária VET 3225. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Pernambuco. Pernambuco, Brasil.
- Gomes, Teixeira, et al. (2009). "Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*." Current Microbiology **59**: 118-122.
- Gomes, Teixeira, et al. (2011). "Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro *Staphylococcus epidermidis* biofilms." The Indian Journal of Medical Research **135**: 542-547.
- Gottlieb (1971). "The effects of hyperbaric oxygen on microorganisms." Annual Review of Microbiology **25**: 111-152.
- Gould (2009). "Antibiotic resistance: the perfect storm." International Journal of Antimicrobial Agents **34**: S2-S5.
- Hamblen (1968). "Hyperbaric oxygenation: its effect on experimental staphylococcal osteomyelitis in rats." The Journal of Bone and Joint Surgery **50**: 1129-1141.
- Hart and Strauss (1990). "Gas gangrene- Clostridial Myonecrosis: A review." Journal of Hyperbaric Medicine **5**: 124-144.
- Heyneman and Lawless-Liday (2002). "Using hyperbaric oxygen to treat diabetic foot ulcers: safety and effectiveness." Critical Care Nurse **22**: 52-60.
- Hill and Osterhout (1972). "Experimental effects of hyperbaric oxygen on selected clostridial species. I. In-vitro studies." The Journal of Infectious Diseases **125**: 17-25.
- Hind and Attwell (1996). "The effect of antibiotics on bacteria under hyperbaric conditions." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **37**: 253-263.
- Hunt, Linsey, et al. (1975). "The effect of differing ambient oxygen tensions on wound infection." Annals of Surgery **181**: 35-39.
- Irvin, Norman, et al. (1966). "Hyperbaric oxygen in the treatment of infections by aerobic microorganisms." The Lancet **1**: 392-394.
- Irvin, Suwanagul, et al. (1967). "The effects of hyperbaric oxygen on *Staphylococcus aureus*." Surgery, Gynecology & Obstetric **125**: 1217-1231.

- John and Harvin (2007). "History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents." Therapeutics and Clinical Risk Management **3**: 1143–1152.
- Khandelwal and Kaide (2010). Hyperbaric oxygen therapy. I. *In: Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide* McGraw-Hill Ed: Tintinalli, Stapczynski, Kelen. Philadelphia, USA McGraw-Hill. pp: e18.1: e1-e8.
- Kloos and Schleifer (1975). "Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species." Journal of Clinical Microbiology **1**: 82-88.
- Lawless-Liday (2002). "Using hyperbaric oxygen to treat diabetic foot ulcers: safety and effectiveness." Critical Care Nurse **22**: 52-60.
- Leach, Rees, et al. (1998). "ABC of oxygen - Hyperbaric oxygen therapy." British Medical Journal **317**: 1140-1143.
- Leite, Gomes, et al. (2011). "In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms." Current Microbiology **63**: 313-317.
- Lipsky (2004). "Medical treatment of diabetic foot infections." Clinical Infectious Diseases **39**: S104-S114.
- Lis, Pacha, et al. (2009). "Methicillin resistance of airborne coagulase-negative staphylococci in homes of persons having contact with a hospital environment." American Journal of Infection Control **37**: 177-181.
- Lowy (2003). "Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*." The Journal of Clinical Investigation **111**: 1265–1273.
- Mack, Becker, et al. (2004). "Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses." International Journal of Medical Microbiology **294**: 203-212.
- Mader, Brown, et al. (1980). "A mechanism for the amelioration by hyperbaric oxygen of experimental *Staphylococcal* osteomyelitis in rabbits." Journal of Infectious Diseases **142**: 915-922.
- Mader and Wilson (1981). "Actinomycosis: a review of the utilization of hyperbaric oxygen." HBOT Review **2**: 177-188.
- Martins (2009). *Staphylococcus - Estudo epidemiológico numa unidade hospitalar do Norte*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal.
- Maureen, McCann, et al. (2008). "*Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management." Journal of Pharmacy and Pharmacology **60**: 1551-1571.
- May, Chan, et al. (2000). "Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **45**: 639-643.
- Mcallister, Stark, et al. (1963). "Inhibitory effects of hypervaric oxygen on bacteria and fungi " The Lancet **2**: 1361-1363.
- Melo, Sillankorva, et al. (2011). Efficacy studies of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriophage against stationary and biofilm cells. Book of Abstracts of MicroBiotec'11 p: 270.

- Mendel, Reichert, et al. (1999). "Therapy with hyperbaric oxygen and cefazolin for experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* in rats." Undersea Hyperbaric Medicine **26**: 169-174.
- Michelim, Lahude, et al. (2005). "Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units." Brazilian Journal of Microbiology **36**: 17-23.
- Międzybrodzki, Fortuna, et al. (2007). "Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment." Postępy higieny i medycyny doświadczalnej **61**: 461-465.
- Moradas Ferreira, Costa, et al. (1996). "The molecular defences against reactive oxygen species in yeast." Molecular Microbiology **19**: 651-658.
- O'Gara and Humphreys (2001). "*Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications." Journal of Medical Microbiology **50**: 582-587.
- Otto (2009). "*Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen." Nature Reviews Microbiology **7**: 555-567.
- Pakman, L. (1971). "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by hyperbaric oxygen." Infection and Immunity **4**: 479-487.
- Park, Muhvich, et al. (1991). "Hyperoxia prolongs the aminoglycoside-induced postantibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35**: 691-695.
- Pennock (1966). "Effect of hyperbaric oxygen on the growth of aerobic organisms in deep culture." The Lancet **1**: 1348-1349.
- Pinheiro (2004). Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras. Dissertação de Doutorado. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Braga, Portugal.
- Pinto, Tanaka, et al. (2003). "Hyperbaric oxygen therapy: principles, indications and perspectives." Scientific-Clinical Odontology **2**: 175-180.
- Presterl, Suchomel, et al. (2007). "Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **60**: 417-420.
- Putman, Burton, et al. (2005). "Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit." Journal of Immunological Methods **302**: 99-102.
- Raad, Hanna, et al. (2007). "Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **51**: 1656-1660.
- Riseman, Zamboni, et al. (1990). "Hyperbaric oxygen therapy for necrotizing fasciitis reduces mortality and the need for debridements." Surgery **108**: 847-850.
- Rodrigues (2011). "Inhibition of bacterial adhesion on medical devices." Advances in Experimental Medicine and Biology **715**: 351-367.
- Sahni, Hukku, et al. (2004). "Recent advances in hyperbaric oxygen therapy." The Association of Physicians of India **14**: 632-639.

- Simões, Simões, et al. (2010). "A review of current and emergent biofilm control strategies." LWT - Food Science and Technology **43**: 573-583.
- Sousa (2007). "Oxigenoterapia hiperbárica (OTHB). Perspectiva histórica, efeitos fisiológicos e aplicações clínica." Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna **14**: 219-227.
- Sousa (2009). *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation onto biomaterials, Universidade do Minho. Dissertação de Doutoramento. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Braga, Portugal.
- Sousa (2011). Oxigénio e medicina subaquática e hiperbárica. Perspectiva histórica e realidade militar em Portugal. In: Coleções Navais. Comissão Cultural de Marinha. Grupo de Estudos e Reflexão Estratégica (GERE). Lisboa, Portugal.
- Cristino (2002). *Staphylococcus*. In: Microbiologia (Volume 2). Ed: Sousa e Ferreira. Lidel, Edições Técnicas. Lisboa, Portugal.
- Theisen (2010). Suscetibilidade de *Staphylococcus epidermidis* à vancomicina, azitromicina e eritromicina. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, Brasil.
- Thom (2011). "Hyperbaric oxygen – its mechanisms and efficacy." Plastic and Reconstructive Surgery **127**: 131S–141S.
- Tibbles and Edelsberg (1996). "Medical progress - Hyperbaric-oxygen therapy." New England Journal of Medicine **334**: 1642-1648.
- Tsuneyoshi, Boyle, et al. (2001). "Hyperbaric hyperoxia suppresses growth of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant strains." Journal of Anesthesia. **15**: 29-32.
- Vuong and Otto (2002). "*Staphylococcus epidermidis* infections." Microbes and Infection **4**: 481-489.
- Weber-Dabrowska, Zimecki, et al. (2006). "Alternative therapies in antibiotic-resistant infection." Advances in Medical Science **51**: 242-244.
- Widiyanti (2011). "Basic mechanism of hyperbaric oxygen in infectious disease." Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease **2**: 49-54.
- Winston, Dudnick , et al. (1983). "Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in patients receiving immunosuppressive therapy." Archives of Internal Medicine **143**: 32-36.
- Wu and Lieber (2001). "Hyperbaric oxygen therapy: ten common questions related to the management of severe necrotizing skin and soft-tissue infections." Infectious Diseases in Clinical Practice **10**: 429-434.
- Ziebuhr, Hennig Susanne, et al. (2006). "Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen." International Journal of Antimicrobial Agents **28**: S14–S20.

