



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ALYNE SOARES FREITAS

**ATIVIDADE DA PROMETAZINA, DEFERIPRONA E MEL DE MANUKA CONTRA
BIOFILMES DE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO *EX*
VIVO DE FERIDAS**

FORTALEZA-CE

2022

ALYNE SOARES FREITAS

ATIVIDADE DA PROMETAZINA, DEFERIPRONA E MEL DE MANUKA CONTRA
BIOFILMES DE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO *EX*
VIVO DE FERIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Ciências Biológicas 3.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

Coorientadora: Profa. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes.

FORTALEZA-CE

2022

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

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

- F936a Freitas, Alyne Soares.
Atividade da prometazina, deferiprona e mel de Manuka contra biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em modelo ex vivo de feridas / Alyne Soares Freitas. – 2022.
60 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
Coorientação: Profa. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes.
1. Feridas. 2. Biofilmes. 3. Modelo ex vivo. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. *Pseudomonas aeruginosa*. I.
Título.

CDD 616.9

ALYNE SOARES FREITAS

ATIVIDADE DA PROMETAZINA, DEFERIPRONA E MEL DE MANUKA CONTRA
BIOFILMES DE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO *EX*
VIVO DE FERIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Ciências Biológicas 3.

Aprovada em: 28/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Silviane Praciano Bandeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Helena Barbosa
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

A Deus.

À minha mãe.

A todos os meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Às professoras Glaucia Guedes e Débora Castelo Branco, pela orientação, pelos ensinamentos, por todas as oportunidades ao longo desses anos e por serem um grande exemplo para mim. Vocês têm o dom de ensinar e são fonte de inspiração para todos seus alunos.

Aos professores Rafael Sampaio e Glaucia Guedes pela participação na banca de qualificação e valiosas sugestões.

À Dra. Silviane Praciano e à professora Maria Helena Barbosa por terem aceitado o convite para participar da banca de defesa e pelas valiosas contribuições.

À minha mãe, pelo amor incondicional, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus familiares, por serem minha fortaleza.

À Arianny e Renata Cruz, por estarem ao sempre ao meu lado, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, pelo companheirismo e amizade. Vocês são incríveis!

Ao Rodrigo (Rod), minha versão masculina (que nem é tão masculina assim rsrs), pela parceria na vida e no laboratório.

Ao Lucas e à Olívia, meus amigos de longa data, que partilharam comigo as mudanças, angústias e conquistas no decorrer desses 14 anos de amizade.

Aos integrantes do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica, em especial ao Vinicius, Carliane, Emanuela, Késia, Jaiane e Luana, pela convivência prazerosa, por toda ajuda e amizade.

Aos amigos estomaterapeutas, Gabriel, Camila, Laura, Joyce, Thaís Lima, Thaís Vaz, Renata Mayra, Fabrícia e Priscila, pelos ensinamentos e amizade.

“It is our choices that show what we truly are,
far more than our abilities.”

(Harry Potter and the Chamber of Secrets)

RESUMO

A infecção é o fator mais comum que leva à cronificação e complicação de feridas, principalmente quando os microrganismos estão na forma de biofilme. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme de prometazina, deferiprona e mel de Manuka contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa in vitro* e em modelo *ex vivo* de ferida em pele porcina. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para prometazina, deferiprona e mel de Manuka foram determinadas contra oito isolados de cada espécie bacteriana. Em seguida, foi avaliado o efeito desses compostos em biofilmes maduros para definir a Concentração Eliminatória Mínima sobre o Biofilme (CEMB) e quantificar a biomassa dos biofilmes. Por fim, os biofilmes foram formados em pele porcina e o efeito dos compostos foi avaliado através da contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) e analisando a arquitetura dos biofilmes por microscopia confocal. As CIMs de prometazina, deferiprona e mel de Manuka variaram de 97,66 - 781,25 µg/mL, 512 - >1024 µg/mL e 10 - 40%, respectivamente, contra ambas as espécies bacterianas. Os valores de CEMB para prometazina, deferiprona e mel de Manuka foram 195,31 - 1562,5 µg/mL, ≥ 1024 µg/mL e de 20 - >40%, respectivamente, para as duas espécies. Quanto à quantificação de biomassa de biofilmes maduros, prometazina causou redução significativa nas concentrações de 781,25 e 195,31 µg/mL para *S. aureus* e de 97,66 - 1562,5 µg/mL para *P. aeruginosa*. A deferiprona reduziu significativamente a biomassa nas concentrações de 512 e 1024 µg/mL para ambas as espécies. Enquanto o mel de Manuka diminuiu a biomassa apenas de *S. aureus*, nas concentrações de 20 e 40%. Com relação aos biofilmes cultivados em modelo *ex vivo*, os três compostos testados reduziram significativamente as contagens de ufc para ambas as espécies bacterianas, alterando a arquitetura do biofilme. Prometazina foi o composto que se mostrou mais eficaz, reduzindo em cerca de 4 log as contagens de ufc, na concentração de CEMB. Prometazina, deferiprona e mel de Manuka têm propriedades antimicrobianas diferentes *in vitro*, mas foram eficazes contra biofilmes cultivados em modelo de ferida *ex vivo*, mostrando seu potencial uso no manejo de feridas associadas a biofilme.

Palavras-chave: Feridas. Biofilmes. Modelo *ex vivo*. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Infection is the most common factor that leads to wound chronicity and complication, especially when microorganisms are in the form of biofilm. Thus, this study aimed to evaluate the antibiofilm activity of promethazine, deferiprone and Manuka honey against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and ex vivo in a wound model on porcine skin. For this, the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) for promethazine, deferiprone and Manuka honey were determined against eight isolates of each bacterial species. Then, the effect of these compounds on mature biofilms was evaluated to define the Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) and quantify the biomass of the biofilms. Finally, biofilms were formed on porcine skin and the effect of the compounds was evaluated by counting Colony-Forming Units (CFUs) and analyzing the architecture of biofilms by confocal microscopy. Promethazine, deferiprone and Manuka honey MICs ranged from 97.66 to 781.25 $\mu\text{g/mL}$, 512 to >1024 $\mu\text{g/mL}$ and 10 to 40%, respectively, against both bacterial species. The minimum biofilm eradication concentrations (MBEC) values for promethazine, deferiprone and Manuka honey were 195.31-1562.5 $\mu\text{g/mL}$, ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ and from 20- $>40\%$, respectively, for the two species. As for the quantification of mature biofilm biomass, promethazine caused a significant reduction in concentrations of 781.25 and 195.31 $\mu\text{g/mL}$ for *S. aureus* and 97.66 - 1562.5 $\mu\text{g/mL}$ for *P. aeruginosa*. Deferiprone significantly reduced biomass at 512 and 1024 $\mu\text{g/mL}$ concentrations for both species. While Manuka honey reduced the biomass only of *S. aureus*, at concentrations of 20 and 40%. Concerning biofilms grown on ex vivo model, the three tested compounds significantly reduced CFU counts for both bacterial species, altering the biofilm architecture. Promethazine was the most effective compound, reducing the CFU counts by about 4 log, in the MBEC concentration. Promethazine, deferiprone and Manuka honey have different in vitro antimicrobial properties, but were effective against biofilms grown on ex vivo wound model, showing their potential use in the management of biofilm-associated wounds.

Keywords: Wounds. Biofilms. Ex vivo model. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– As quatro fases do processo de cicatrização. A) Hemostasia; B) Fase inflamatória; C) Fase proliferativa; D) Fase de remodelamento	19
Figura 2	– Úlceras venosas. A) Mecanismo fisiopatológico, apresentando válvula venosa incompetente e competente; B) Exemplo clínico de úlcera venosa.....	20
Figura 3	– Exemplo clínico de úlcera arterial	21
Figura 4	– Úlcera do pé diabético. A) Vias de ulceração, sendo resultado de uma combinação de polineuropatia diabética sensitivo-motora e autonômica com Doença Arterial Periférica (DAP); B) Exemplo clínico	21
Figura 5	– Exemplo clínico de Lesão por Pressão	23
Figura 6	– Diferentes estágios de formação do biofilme	24
Figura 7	– Membrana viscosa, translúcida e brilhante aderida, sugerindo a presença de biofilme	25
Figura 8	– Desenho esquemático para o teste de sensibilidade	33
Figura 9	– Fragmento de pele após confecção da ferida	35
Figura 10	– Fragmento de pele após formação de biofilme	36
Figura 11	– Placas de microdiluição evidenciando a atividade metabólica celular após exposição à prometazina. À esquerda, placa contendo as cepas de <i>S. aureus</i> e à direita, as de <i>P. aeruginosa</i> . A resazurina mantém sua cor azul nos poços onde não há viabilidade celular e na presença de metabolismo celular, é reduzida em resorufina, alterando sua cor original	39
Figura 12	– Fragmentos de pele após tratamento. A) SF 0,9%; B) Prometazina; C) Deferiprona; D) Mel de Manuka	41
Figura 14	– Microscopia confocal dos biofilmes bacterianos em modelo <i>ex vivo</i> após o tratamento com SF 0,9%, prometazina (195,31 µg/mL para <i>S. aureus</i> e 781,25 µg/mL para <i>P. aeruginosa</i>), deferiprona (512 µg/mL para <i>S. aureus</i> e 1024 µg/mL para <i>P. aeruginosa</i>) e mel de Manuka (40% para <i>S. aureus</i> e	

20% para *P. aeruginosa*). Quando coradas em verde, as células estão viáveis, quando em vermelho, as células tiveram sua parede danificada 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPase	Adenosina trifosfatase
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEMB	Concentração Eliminatória Mínima sobre o Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
EPS	Exopolissacarídeo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
LP	Lesão por Pressão
MGO	Metilglioxal
MH	<i>Mueller Hinton</i>
MDR	Multidroga-resistente
PHMB	Polihexametileno biguanida
QS	<i>Quorum sensing</i>
SF	Soro Fisiológico
ufc	Unidades formadoras de colônias
UFC	Universidade Federal do Ceará
UMF	<i>Unique Manuka Factor</i>
UPD	Úlceras do Pé Diabético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Fases da cicatrização	17
2.2	Feridas agudas e crônicas	19
2.3	Feridas infectadas	23
2.4	Biofilmes em feridas	24
2.5	Tratamento de feridas associadas a biofilme	25
2.6	Prometazina	28
2.7	Deferiprona	29
2.8	Mel de Manuka	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Microrganismos do estudo	32
4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de prometazina, deferiprona e mel de Manuka contra os isolados de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	32
4.3	Avaliação do efeito <i>in vitro</i> da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre os biofilmes maduros de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	33
4.4	Obtenção, processamento, desinfecção da pele porcina e formação da ferida	34
4.5	Formação do biofilme na ferida e avaliação da ação de prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre os biofilmes maduros formados em modelos <i>ex vivo</i>	35
4.6	Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em modelo <i>ex vivo</i> de feridas	37
4.7	Análise estatística	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) da prometazina, deferiprona e mel de Manuka contra os isolados de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	38

5.2	Efeito da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre os biofilmes maduros de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	39
5.3	Efeito da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre biofilmes em modelo <i>ex vivo</i> de feridas	40
5.4	Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em modelo <i>ex vivo</i> de feridas	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Uma ferida pode ser definida como a perda de solução de continuidade da pele decorrente da exposição ao calor, frio, materiais corrosivos, radiação, problemas circulatórios, entre outros (KANGAL; REGAN, 2021; MORIN *et al.*, 2012). Em resposta a esses danos, inicia-se o processo de cicatrização, que tem por finalidade o restabelecimento da função e integridade do tecido lesado (WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2021). Uma ferida que não progride nas fases do processo de reparação tecidual fisiológico é considerada crônica e é caracterizada por permanecer estagnada na fase inflamatória (JARBRINK *et al.*, 2017; KANGAL; REGAN, 2021; NUNAN; KEITH; PAUL, 2014).

Dentre os principais fatores que acarretam na cronificação e na complicação dessas feridas, a infecção é o mais comum e de maior risco (KIM, 2019; LEWIS; PAY, 2021; NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018; WILLIAMS, 2021; ZABAGLO; SHARMAN, 2021). Os principais microrganismos associados a esse fenômeno são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, podendo ser encontrados na forma planctônica ou de biofilmes.

Biofilmes são comunidades organizadas de microrganismos aderidos entre si e a uma superfície, biótica ou abiótica, envoltos por uma matriz de exopolissacarídeos (KAISER; WACHTER; WINDBERGS, 2021; NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018). Apesar de também serem encontrados em feridas agudas, os biofilmes são mais prevalentes nas crônicas, estando presente em 60 a 78% dos casos (MALONE *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2013).

A presença constante dessas comunidades microbianas no leito da ferida estimula uma resposta inflamatória crônica que altera a progressão da reparação tecidual (OMAR *et al.*, 2017). Além disso, os antimicrobianos possuem eficácia limitada quando esses microrganismos estão na forma de biofilmes, sendo encontrada uma tolerância aos fármacos até 1000 vezes maior se comparado à forma planctônica (KAISER; WACHTER; WINDBERGS, 2021; RAMAGE *et al.*, 2012).

Nesse contexto de resistência, o reposicionamento de fármacos tem ganhado destaque na pesquisa por novas estratégias terapêuticas (GAJDÁCS; SPENGLER, 2019; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). A prometazina, um derivado da fenotiazina utilizado na clínica como anti-histamínico, tem sido apontado como um fármaco com atividade antimicrobiana (ROQUINI *et al.*, 2019). Além disso, esse medicamento já se mostrou eficaz

contra biofilmes bacterianos, afetando as moléculas de *Quorum-sensing* e a atividade de bombas de efluxo, essenciais para a manutenção e sobrevivência de comunidades microbianas (SIDRIM *et al.*, 2017).

Uma outra alternativa ao uso de antimicrobianos clássicos é a utilização de quelantes de ferro, compostos que atuam capturando esse íon, tornando-o indisponível ao patógeno (HOUSHMANDYAR; EGGLESTON; BOLHUIS, 2021; RICHTER *et al.*, 2017). A deferiprona, um quelante de ferro utilizado no tratamento de pacientes talassêmicos com sobrecarga de ferro, tem apresentado função antimicrobiana contra algumas espécies bacterianas e fúngicas na forma planctônica e de biofilme (AMMENDOLA *et al.*, 2021; KIM; SHIN, 2009; RICHTER *et al.*, 2017).

Compostos naturais, como o mel de Manuka, também têm se destacado devido ao seu potencial antimicrobiano e antibiofilme (KIM; KANG, 2020; ROSSITER; FLETCHER; WUEST, 2017; SHIRLAW *et al.*, 2020). Seu principal diferencial em relação a outros tipos de mel é a elevada concentração de metilglioxal (MGO), responsável pelo seu efeito antimicrobiano juntamente com outras características, como o alto teor de açúcar, baixo pH, formação de peróxido de hidrogênio, o peptídeo antimicrobiano defensina-1 de abelha e o glicosídeo leptosina (BOUZO *et al.*, 2020; GOSLINSKI; NOWAK; KLEBUKOWSKA, 2020; JOHNSTON *et al.* 2018).

Atualmente, as estratégias de tratamento antibiofilme em feridas dependem de técnicas não específicas de preparo do leito, envolvendo desbridamento e limpeza, porém tecnologias projetadas para gerenciar especificamente o biofilme ainda são limitadas. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme da prometazina, deferiprona e mel de Manuka em modelo *ex vivo* de feridas em pele porcina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha funções essenciais para sua proteção e manutenção, como integrar o sistema imune inato, participar da síntese de vitaminas, evitar perda excessiva de fluidos, regular a temperatura, além de diversas outras funções que participam da homeostase dos animais (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019; TOTTOLI *et al.*, 2020).

As feridas são caracterizadas como uma ruptura na estrutura e função da anatomia normal dos tecidos (CHHABRA *et al.*, 2017). Estima-se uma prevalência global de feridas crônicas de aproximadamente 2.21/1000 habitantes (MARTINENGO *et al.*, 2019), apresentando grande impacto econômico para a saúde pública e afetando a qualidade de vida das pessoas que vivem com feridas e seus cuidadores (OLSSON *et al.*, 2018).

É fundamental adotar um manejo e tratamento adequados para evitar as complicações associadas às feridas, como cronificação da lesão, celulite, abscesso, osteomielite, bacteremia, sepse e, em casos extremos, o óbito (JÄRBRINK *et al.*, 2016; POWERS *et al.*, 2016; ZABAGLO; SHARMAN, 2021).

2.1 Fases da cicatrização

Após o início de uma lesão, uma sucessão de eventos é desencadeada a fim de reparar o dano tecidual e promover a cicatrização. O processo de reparação tecidual é dividido didaticamente em quatro fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa e remodelação (DALISSON; BARRALET, 2019).

Imediatamente após a quebra da integridade da pele inicia-se a hemostasia (Figura 1A). As alterações nas células endoteliais e a ruptura de vasos sanguíneos promovem liberação de substâncias vasoconstritoras, ativação da cascata de coagulação e formação do coágulo de fibrina a fim de controlar o sangramento e fornecer um ambiente para que as plaquetas secretem fatores de crescimento e citocinas (KANGAL; REGAN, 2021; WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2021).

Essa vasoconstrição é de curta duração, sendo seguida de vasodilatação e influxo de glóbulos brancos, dando início à fase inflamatória (Figura 1B). Os neutrófilos são os primeiros a serem recrutados, além de promoverem degradação de restos celulares e eliminação de bactérias por fagocitose e secreção de proteases, atuam como quimioatraentes para outras células e aumentam a resposta inflamatória através da liberação de citocinas pró-

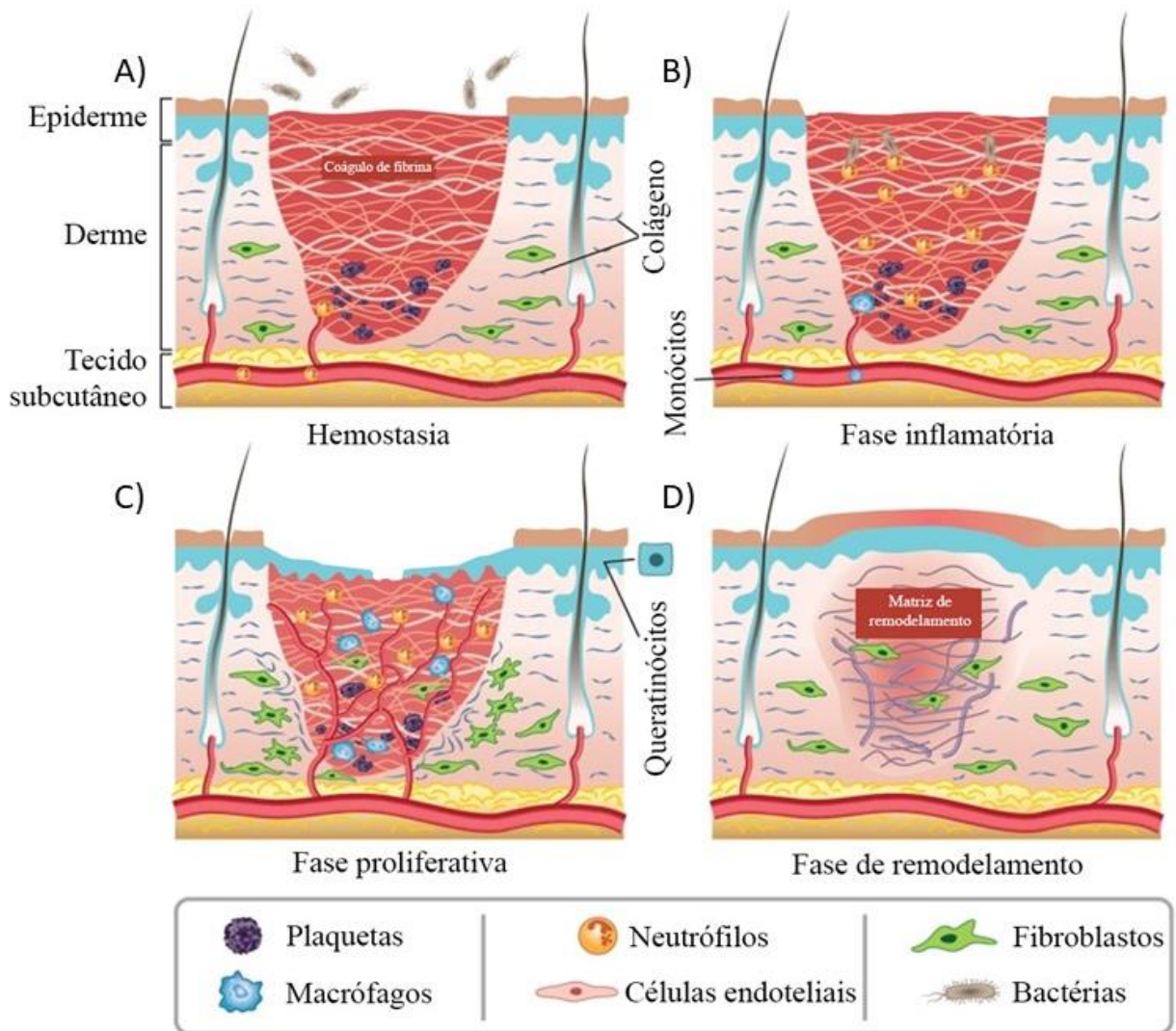
inflamatórias. A fagocitose é posteriormente continuada pelos macrófagos, que também liberam citocinas, recrutando e ativando leucócitos adicionais, bem como estimulam queratinócitos, fibroblastos e angiogênese a fim de promover a regeneração tecidual (GUO; DIPIETRO, 2010; WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2021).

A etapa subsequente, a proliferativa, tem como principal objetivo a formação do tecido de granulação (Figura 1C). Os fibroblastos migram da derme da borda da ferida para o leito e começam a sintetizar uma matriz provisória contendo colágeno do tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina. Durante essa fase, ocorre a necessidade de um suprimento sanguíneo adequado, iniciando, assim, uma resposta angiogênica simultaneamente (GONZALEZ *et al.*, 2016; KANGAL; REGAN, 2021).

O processo de cicatrização é finalizado com a fase de remodelamento (Figura 1D). Na tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, a matriz de colágeno tipo III previamente depositada é lentamente substituída por um colágeno mais estável, o tipo I (GONZALEZ *et al.*, 2016; WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2021).

Em todas essas fases, é importante ressaltar que vários fatores podem modular tais eventos e influenciar adversamente no processo de cicatrização. Dentre eles, os principais são o processo infeccioso, uso de corticoterapia, tabagismo e distúrbios sistêmicos, como diabetes, imunossupressão e estase venosa (GONZALEZ *et al.*, 2016).

Figura 1 - As quatro fases do processo de cicatrização. A) Hemostasia; B) Fase inflamatória; C) Fase proliferativa; D) Fase de remodelamento.



Fonte: Adaptado de NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018.

2.2 Feridas agudas e crônicas

As feridas podem ser classificadas em agudas e crônicas. As agudas progridem através das fases do processo de cicatrização, levando ao reparo tecidual em tempo adequado, sem complicações. Geralmente são originadas por cirurgias ou traumas (PRAKASH *et al.*, 2022; UBBINK *et al.*, 2015).

Em contrapartida, as feridas crônicas demoram mais tempo e demandam mais esforço para cicatrizarem, permanecendo estagnadas na fase inflamatória, podendo apresentar altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, infecções persistentes, formação de biofilmes

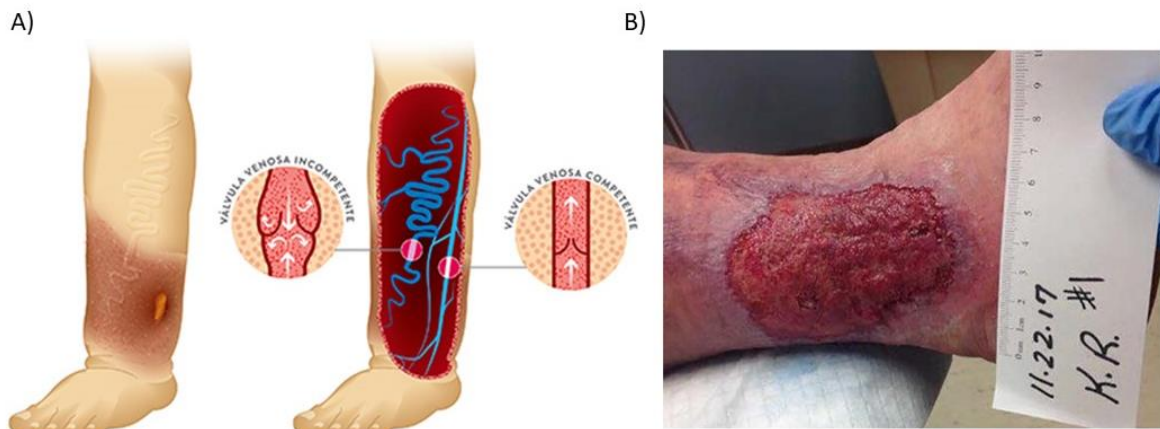
microbianos e células senescentes que não respondem a estímulos reparadores (BOWERS; FRANCO, 2020; RAZIYEVA *et al.*, 2021; UBBINK *et al.*, 2015).

Embora não haja consenso sobre a partir de quanto tempo uma ferida pode ser considerada crônica, a maioria dos autores refere ser de um a três meses (JARBRINK *et al.*, 2017; KANGAL; REGAN, 2021; NUNAN; KEITH; PAUL, 2014; PRAKASH *et al.*, 2022).

De acordo com a etiologia, as feridas crônicas podem ser comumente classificadas em quatro categorias: úlceras venosas, úlceras arteriais, Úlceras do Pé Diabético (UPD) e Lesões por Pressão (LP) (BOWERS; FRANCO, 2020).

As úlceras venosas são as úlceras de perna mais prevalentes, representando cerca de 70% a 80%, afetando aproximadamente 2% da população (RAFFETTO *et al.*, 2020). São decorrentes da hipertensão venosa nos membros inferiores, causada por um ou mais fatores, como obstrução do fluxo sanguíneo, incompetência valvular, que permite o fluxo retrógrado, e falência do músculo da panturrilha, que resulta em esvaziamento incompleto das veias durante a deambulação (MILLAN *et al.*, 2019; ROBLES-TENORIO; LEV-TOV; OCAMPO-CANDIANI, 2022) (Figura 2).

Figura 2 - Úlceras venosas. A) Mecanismo fisiopatológico, apresentando válvula venosa incompetente e competente; B) Exemplo clínico de úlcera venosa.



Fonte: BOWERS; FRANCO, 2020; PAZ-DIAS, 2021.

As úlceras arteriais ocorrem como resultado da redução do fluxo sanguíneo arterial em razão do estreitamento progressivo do lúmen do vaso e da perfusão tecidual subsequente (LANGER, 2014). Na Figura 3 podemos encontrar um exemplo de úlcera arterial.

Figura 3 - Exemplo clínico de úlcera arterial.

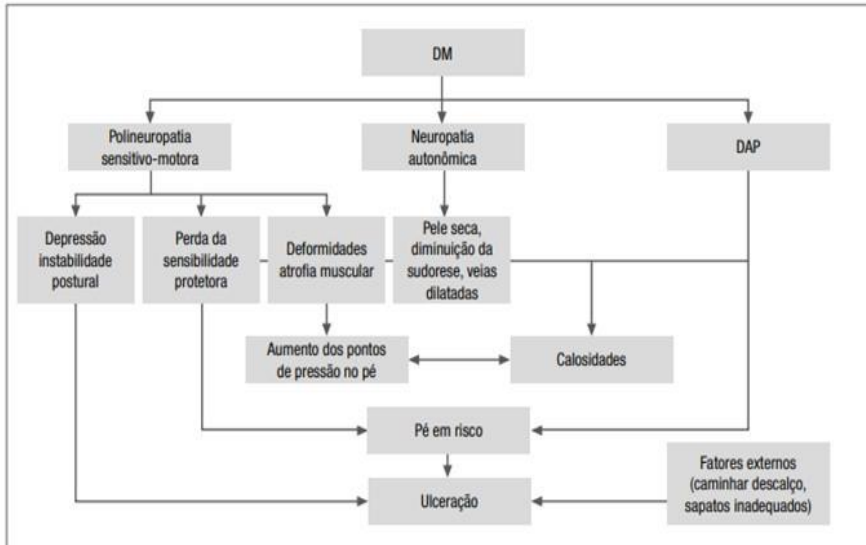


Fonte: BOWERS; FRANCO, 2020.

Quanto às UPD, são consideradas multifatoriais, resultando de uma combinação de neuropatia diabética autonômica e polineuropatia diabética sensitivo-motora, que leva a deformidades musculoesqueléticas que alteram a biomecânica do pé e tornozelo e pontos de pressão anormais, complicando-se pela doença arterial periférica. Estima-se que cerca de 15 a 25% das pessoas com diabetes desenvolverão uma úlcera ao longo da vida. Essas úlceras são responsáveis por cerca de 20% das internações hospitalares em pacientes diabéticos e por 50 a 70% de todas as amputações de membros inferiores. A cada trinta segundo ocorre uma amputação decorrente dessa complicação (OLIVER; MUTLUOGLU, 2022; STAR, 2018) (Figura 4).

Figura 4 - Úlcera do pé diabético. A) Vias de ulceração, sendo resultado de uma combinação de polineuropatia diabética sensitivo-motora e autonômica com Doença Arterial Periférica (DAP); B) Exemplo clínico.

A)



B)



Fonte: OLIVER; MUTLUOGLU, 2022; SBD, 2019.

Antigamente chamadas de úlceras por pressão e escaras, as LP resultam em um dano na pele e/ou tecidos moles subjacentes decorrente da pressão prolongada em combinação com a fricção e/ou cisalhamento, principalmente em locais de proeminência óssea. Com isso, ocorre a oclusão de vasos, diminuição do aporte de oxigênio para os tecidos, necrose tecidual e possível ulceração local (AGRAWAL; CHAUHAN, 2012; NPUAP, 2016). A Figura 5 apresenta um exemplo de LP.

Estima-se que a incidência global de LP chega a 12% e sua prevalência a 12,8% (BOROJENY *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020). A maioria dessas lesões é evitável com atenção as superfícies de contato, mudança de posição frequente, nutrição adequada e gerenciamento da umidade (MERVIS; PHILLIPS, 2019).

Figura 5 - Exemplo clínico de Lesão por Pressão.



Fonte: ISHIKAWA *et al.*, 2021.

2.3 Feridas infectadas

As feridas crônicas proporcionam um ambiente favorável para a invasão e proliferação de patógenos e, portanto, muitas vezes ocorrem infecções. A infecção é a complicação mais frequente e de maior risco em feridas. Embora as bactérias sejam uma parte da microbiota da pele e, portanto, das feridas, sua presença não necessariamente caracteriza uma infecção (HAN; CEILLEY, 2017).

Um limiar de 10^5 unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de tecido foi proposto como a delimitação entre a colonização e a infecção. A presença de infecção gera uma resposta imunológica do hospedeiro, surgindo sintomas e sinais clínicos como dor, edema, eritema, calor e exsudato purulento, impactando diretamente no processo de cicatrização (HAN; CEILLEY, 2017; KAISER; WACHTER; WINDBERGS, 2021).

S. aureus e *P. aeruginosa* são os microrganismos mais frequentemente isolados de feridas infectadas, enquanto o gênero de fungos mais comum é *Candida* spp. Esses podem ser encontrados em sua forma planctônica ou em biofilmes (KAISER; WACHTER; WINDBERGS, 2021; NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018).

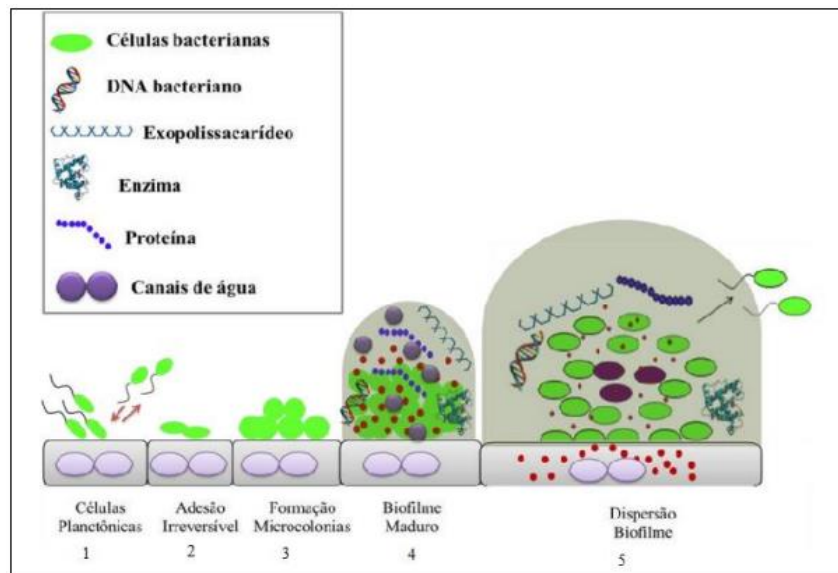
A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (2012) traz que, além dos sinais e sintomas clássicos, fatores como: exposição óssea, cronificação da ulcera, recorrência da ulceração, alteração vascular do membro, alteração no tecido de granulação, entre outros, podem ser de alto risco para infecção (LIPSKY *et al.*, 2012).

2.4 Biofilmes em feridas

Biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos entre si e à uma superfície, envoltos por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) composta de água, substâncias poliméricas extracelulares, DNA e lipídios (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2016; WICKRAMASINGHE *et al.*, 2020; KAISER; WACHTER; WINDBERGS, 2021). O biofilme atua como fator mecânico de proteção para os microrganismos contra agentes antimicrobianos e células do sistema imune do hospedeiro, tornando-os até 1000 vezes mais resistentes do que aqueles em estado planctônico (KAISER; WACHTER; WINDBERGS, 2021; RAMAGE *et al.*, 2012).

Os biofilmes microbianos se desenvolvem em 5 estágios, conforme apresentado na Figura 6: 1 - Adsorção das células bacterianas a superfície, criando uma adesão reversível; 2 - Adesão bacteriana irreversível à superfície, aumentando a força de atração; 3 - Divisão celular e formação de microcolônias; 4 - Maturação do biofilme, com a formação de canais de água e poros para permitir o fornecimento de nutrientes, bem como a remoção de produtos residuais; e 5 - Dispersão das células bacterianas do biofilme (GUZMÁN-SOTO *et al.*, 2021).

Figura 6 - Diferentes estágios de formação do biofilme.



Fonte: OCADAQUE, 2020.

No processo de formação do biofilme, os microrganismos utilizam um mecanismo de comunicação intercelular conhecido como *Quorum Sensing* (QS), que consiste na produção, liberação e detecção de moléculas de sinalização química para o meio. Essas

moléculas se acumulam localmente e, após atingir a concentração limite adequada, interagem com a proteína receptora levando a mudanças coordenadas na expressão de genes específicos. Essa comunicação permite regular a expressão gênica e fatores de virulência (PALUCH *et al.*, 2020).

Estima-se uma prevalência superior a 60% de biofilmes em feridas crônicas, com uma média de 78,2% nos estudos de revisão (MALONE *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2019). Não há uma manifestação clínica específica para o diagnóstico de biofilme em feridas, assim como não é feito nenhum teste de rotina para a confirmação de sua presença. Todavia há sinais clínicos e condições que sugerem sua existência no leito das feridas, como uma membrana viscosa, translúcida e brilhante aderida, tecido de granulação friável, falha dos antimicrobianos, cronificação da ferida e inflamação persistente (Figura 7) (METCALF; BOWLER; HURLOW, 2014; WEI *et al.*, 2019).

Figura 7 - Membrana viscosa, translúcida e brilhante aderida, sugerindo a presença de biofilme.



Fonte: METCALF; BOWLER; HURLOW, 2014.

2.5 Tratamento de feridas associadas a biofilme

O manejo de biofilmes em feridas consiste principalmente em desbridamento seriado, utilização de agentes antimicrobianos tópicos, além do uso de antimicrobianos sistêmicos quando necessário (KAISER; WACHTER; WINDBERGS, 2021).

O desbridamento é considerado fundamental, pois permite a remoção de tecido desvitalizado que fornece um ponto de fixação para a adesão de microrganismos e formação de biofilme (WEI *et al.*, 2019). Todavia Roy e colaboradores (2014) observaram em seus estudos que as unidades formadoras de colônias de *P. aeruginosa* retornaram a níveis quase iniciais em cerca de 48 horas após o desbridamento, demonstrando, assim, que essa técnica sozinha não é eficaz no controle do biofilme.

Dentre as opções terapêuticas para o tratamento tópico de feridas associadas a biofilme, compostos à base de prata têm sido bastante utilizados. A prata foi usada pela primeira vez na década de 1960, sabe-se que o íon prata leva à morte celular por meio de múltiplos mecanismos, como desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos e aumento da permeabilidade da membrana (BRITO; LEITE, 2021; KRAMER *et al.*, 2018).

Um dos impactos da utilização da prata é a citotoxicidade contra queratinócitos e fibroblastos. Khansa *et al.* (2019) definem um curativo ideal como aquele contendo esse íon numa concentração sustentada por vários dias, que tenha efeito bactericida (≥ 30 ppm), mas sem causar toxicidade (≤ 60 ppm).

A sulfadiazina de prata, por sua vez, libera uma concentração inicial de prata extremamente alta na ferida (até 3.176 ppm), mas que rapidamente diminui abaixo dos níveis terapêuticos. Dessa forma, podendo apresentar toxicidade local, sem fornecer os níveis sustentados de prata necessários para a atividade bactericida (KHANSA *et al.* 2019).

Embora a sulfadiazina de prata seja amplamente utilizada, principalmente em queimaduras, demonstrou ser menos efetiva quando comparada a outros compostos, como aloe vera e mel (SHAHZAD; AHMED, 2013; ZORIAH; HASSAM, 2017).

Coberturas mais recentemente desenvolvidas contêm prata em estado nanocristalino, liberando prata de forma sustentada e mantendo uma concentração ligeiramente acima do limite (70 ppm) por vários dias (KHANSA *et al.* 2019).

Contudo devido ao uso indiscriminado de compostos contendo prata, resistência adquirida já foi descrita em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* (HOSNY *et al.*, 2019).

Da mesma forma, compostos contendo iodo têm sido utilizados há mais de um século no tratamento dessas feridas (VERMEULEN *et al.*, 2010). Preparações aquosas e alcoólicas, assim como a utilização do iodo em sua forma elementar já foram empregados para o tratamento de feridas, porém efeitos adversos como dor local, irritação e mudança de coloração da pele no local da aplicação eram associados ao seu uso (SIBBALD *et al.*, 2017).

Porém, atualmente, formulações mais seguras foram desenvolvidas e coberturas a base de iodo, como curativos de cadexômero de iodo, liberam esse composto lentamente na superfície da ferida (SIBBALD *et al.*, 2017). Uma vez na ferida, o iodo é capaz de desestabilizar a membrana celular bacteriana através da oxidação de ácidos graxos, aminoácidos e ácidos nucleicos, além de interromper vias metabólicas internas e desativar enzimas citosólicas, justificando seu efeito antibacteriano (ALVES *et al.*, 2021).

Ademais, tem amplo espectro de atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de fungos. Ainda não foi relatado resistência a esse composto, porém a utilização de iodo no manejo de feridas ainda é motivo de discussão (VERMEULEN *et al.*, 2010).

Kramer *et al.* (2018) e Gmur e Karpinski (2020) relatam que o iodo é citotóxico, dificultando o reparo tecidual e consequente cicatrização da ferida. Além disso, Vermeulen *et al.* (2010) afirmam que o iodo está associado a reações alérgicas e má penetração na ferida.

Outro composto utilizado na prática clínica no manejo de biofilmes é o polihexametileno biguanida (PHMB), que é utilizado há mais de 60 anos (MATTOS *et al.*, 2019). De acordo com De Paula *et al.*, (2011), o PHMB se liga aos fosfolipídios carregados negativamente na parede celular bacteriana, tornando-a mais rígida e afundando os segmentos apolares nos domínios hidrofóbicos, esse processo rompe a membrana bacteriana causando a morte celular microbiana.

Dentre os agentes descritos neste tópico, o PHMB é o mais utilizado para tratar feridas agudas e crônicas infectadas e sua eficácia é comprovada contra diversas bactérias Gram negativas, Gram positivas e *Candida albicans*. Porém quando se avalia a ação desse contra biofilmes de *S. aureus*, importante microrganismo associado a infecções em feridas, os dados que se apresentam ainda são conflitantes (ALVES *et al.*, 2021).

Nesse contexto, Trostrup *et al.*, (2020) e Moghadam *et al.*, (2020) pontuam a importância de fundamentar novas terapias de intervenção às feridas crônicas, especialmente no contexto de biofilmes e da resistência antimicrobiana, uma vez que já é relatada a não completa eficácia dos antissépticos em uso contra biofilmes de algumas espécies, além da falha da antibioticoterapia intravenosa para o tratamento de cepas multirresistentes.

Assim, faz-se necessário pesquisar novas estratégias terapêuticas, como a busca por produtos naturais e novos compostos com atividade antimicrobiana, além de outras alternativas como o desenvolvimento de nanopartículas ou uso de bacteriófagos no combate dessas infecções (MOGHADAM *et al.*, 2020).

Nos tópicos a seguir, serão apresentados alguns compostos que vêm sendo elencados com propriedades antimicrobianas e antibiofilme contra diversas espécies bacterianas de interesse médico, são eles: a prometazina, a deferiprona e o mel de Manuka, que podem se apresentar como alternativas interessantes no manejo de biofilmes em feridas.

2.6 Prometazina

A Prometazina é uma fenotiazina que atua bloqueando os sítios do receptor H1 e impedindo a ação da histamina na célula. Possui atividade anti-histamínica, antidopaminérgica e anticolinérgica e é uma droga aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para sedação e tratamento de alergias, náuseas e vômitos (DIAZ-ARTILES *et al.*, 2017; SOUTHARD; KHALILI, 2022). Além disso, esse composto tem apresentado efeito antimicrobiano contra bactérias e fungos em forma planctônica e de biofilme (BRILHANTE *et al.*, 2020; SIDRIM *et al.*, 2016).

Seu efeito antimicrobiano ocorre por afetar a adenosina trifosfatase (ATPase) e genes que regulam a permeabilidade em bactérias, garantindo que as moléculas de prometazina cheguem aos sítios de DNA, intercalem-se entre as bases e, conseqüentemente, dificultem os processos de transcrição e tradução do DNA (AKINJOGUNLA *et al.*, 2021).

Ademais, demonstrou ser capaz de inibir as bombas de efluxo, um dos mecanismos responsáveis pela resistência a antibióticos em bactérias. Isso se deve através da inibição da ligação do cálcio à ATPase dependente de cálcio da membrana plasmática. Sua atividade já foi descrita em bombas de efluxo como a *NorA* de *Staphylococcus aureus*, a *QAC* de *Staphylococcus aureus* multirresistente e a *AcrAB* de *Escherichia coli* (LAGADINOU *et al.*, 2020).

Quanto ao seu efeito antibiofilme, atribui-se às suas propriedades inibidoras de QS, supostamente devido à inibição da detecção de sinal ou através da modificação da expressão gênica nessas bactérias (GAJDÁCS; SPENGLER, 2019). Ademais, Cordeiro e colaboradores (2020) mostraram que a prometazina foi capaz de inibir a adesão celular e dificultar o desenvolvimento de biofilmes.

Além de ter potencial para tratamento de infecções associadas a biofilmes, a prometazina também é capaz de diminuir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Eliminatória Mínima sobre o Biofilme (CEMB) de antimicrobianos clássicos, tendo efeito sinérgico para potencializar o efeito desses (SIDRIM *et al.*, 2016). Esse composto

também já foi utilizado contra cepas de *P. aeruginosa in vitro*, onde reverteu a tolerância a tobramicina adquirida por essas bactérias na forma de biofilme (DONNERT *et al.*, 2020).

2.7 Deferiprona

O Ferro é essencial para o crescimento e manutenção das bactérias, estando ligado a diversos processos metabólicos e participando da patogenicidade, além de desempenhar um importante papel na formação de biofilmes. Em *Staphylococcus spp.*, a presença do ferro está envolvida na capacidade de adesão célula a célula e a uma superfície sólida (LIN *et al.*, 2012). Já em *Pseudomonas aeruginosa*, o ferro pode regular a formação de biofilme através da via de sinalização QS (ZHANG *et al.*, 2020).

Assim, a restrição de ferro apresenta-se como uma estratégia promissora, uma vez que dificultaria o crescimento dos microrganismos e a formação de biofilmes. A utilização de quelantes de ferro seria um meio de alcançar esse efeito (CORAÇA-HUBER *et al.*, 2018).

A deferiprona é um quelante capaz de se ligar fortemente ao ferro e a outros metais com menor afinidade. É utilizado na clínica para o tratamento de talassemia e hemocromatose secundária a transfusões sanguíneas, sendo capaz de diminuir a quantidade de ferro sérica e nos tecidos, porém, ainda é associada a efeitos colaterais, principalmente hepatotoxicidade (KITTIPOOM *et al.*, 2022).

Esse composto isolado não tem apresentado forte efeito antibiofilme, porém, associado a antimicrobianos foi capaz de diminuir carga microbiana, desestruturar e até destruir completamente biofilmes de cocos Gram positivos (CORAÇA-HUBER *et al.*, 2018). Quando testada contra cepas de *P. aeruginosa*, deferiprona mostrou atividade moderada contra o microrganismo na forma planctônica, porém foi capaz de inibir a formação de biofilmes por limitar a quantidade de ferro livre (HOUSHMANDYAR *et al.*, 2021).

A utilização tópica de drogas é uma estratégia que potencializa a concentração no local da infecção e minimiza os efeitos colaterais sistêmicos. Assim, esse composto já vem sendo testado junto a hidrogéis contra diversos microrganismos. Isoladamente, apresenta efeito antibiofilme com diminuição das unidades formadoras de colônia de *S. aureus*, porém, necessita da combinação com outros compostos ou antimicrobianos para potencializar o efeito contra biofilmes de *P. aeruginosa* (RICHTER *et al.*, 2017).

2.8 Mel de Manuka

Além do reposicionamento de fármacos, uma alternativa explorada é a utilização de compostos naturais com efeito antimicrobiano. Isso se justifica pela possibilidade de alcançar bons efeitos terapêuticos evitando a toxicidade dos antimicrobianos clássicos. O mel de Manuka é um composto derivado da flor *Leptospermum scoparium* encontrada principalmente na Nova Zelândia, e tem apresentado efeito antimicrobiano e antibiofilme, além de apresentar efeito contra o odor e auxiliar no desbridamento autolítico (KWIECIŃSKA-PIRÓG *et al.*, 2020).

O mel de Manuka é composto por carboidratos, minerais, proteínas, ácidos graxos, compostos fenólicos, flavonoides e um nível elevado de metilglioxal (MGO) que o difere, em composição, dos outros tipos de mel. Sua atividade antimicrobiana deve-se às suas características e componentes, como a alta concentração de açúcar e baixo pH (inibem o crescimento microbiano), peróxido de hidrogênio, elevada concentração de metilglioxal (componente que pode reagir inespecificamente com moléculas de DNA, RNA e proteínas, desestabilizando a célula bacteriana), o peptídeo antimicrobiano defensina-1 de abelha e o glicosídeo leptosina (JOHNSTON *et al.* 2018; BOUZO *et al.*, 2020; GOSLINSKI *et al.*, 2020).

O sistema de classificação *Unique Manuka Factor* (UMF) reflete a concentração de MGO no mel de Manuka que é vendido comercialmente. Os valores encontrados no mercado são de 5+, 10+ e 15+, porém o UMF por si só não é considerado um indicador confiável do efeito antibacteriano (GIRMA; SEO; SHE, 2019).

A utilização do mel de Manuka, mesmo que em baixas concentrações, tem se mostrado uma alternativa promissora no tratamento de feridas infectadas. Lu e colaboradores (2019) testaram o produto e seus compostos contra biofilmes de *P. aeruginosa* e mostraram que esses inibiram a formação e reduziram biofilmes pré-formados, sendo capaz de erradicar o biofilme em maiores concentrações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibiofilme da prometazina, deferiprona e mel de Manuka em modelo *ex vivo* de feridas.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na forma planctônica à prometazina, deferiprona e mel de Manuka;
2. Analisar o efeito *in vitro* da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
3. Avaliar o efeito da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre biofilmes formados em modelo *ex vivo* de feridas em pele porcina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos do estudo

Para os experimentos *in vitro* foram utilizadas dezesseis cepas, oito *Staphylococcus aureus* e oito *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre as cepas de *S. aureus*, três eram sensíveis à oxacilina, quatro eram resistentes a essa droga e uma cepa era de referência (*S. aureus* ATCC 29213). Dentre as cepas de *P. aeruginosa*, quatro eram consideradas multidroga-resistentes (MDR), por serem resistentes a cefalosporinas, carbapenêmicos e quinolonas, três eram sensíveis a esses fármacos e uma cepa era de referência (*P. aeruginosa* ATCC 27853).

Os ensaios *ex vivo* foram realizados com quatro cepas, uma resistente de *S. aureus*, uma resistente de *P. aeruginosa* e uma cepa padrão de cada espécie (*S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* ATCC 27853).

As cepas clínicas, oriundas de feridas crônicas e abscessos, estavam mantidas em meio mínimo na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de prometazina, deferiprona e mel de Manuka contra os isolados de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

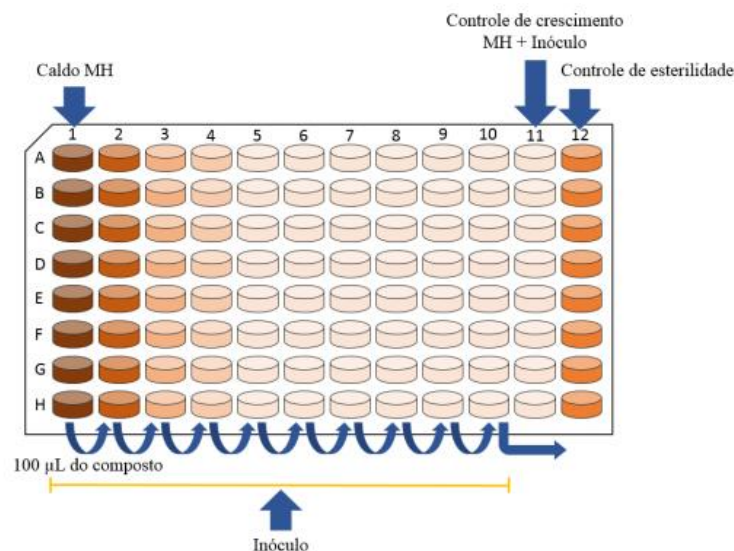
A sensibilidade das bactérias em forma planctônica foi testada por microdiluição em caldo, em placas de 96 poços de fundo U, de acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute* (2021). Inicialmente, os microrganismos foram crescidos em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 horas, a 37 °C, em estufa bacteriológica. Posteriormente, foram semeados em ágar BHI para o crescimento de colônias por mais 24 horas, a 37 °C. Após esse período, os inóculos bacterianos foram preparados utilizando as colônias numa escala 0,5 de McFarland e diluídos até alcançarem a concentração final de 5×10^5 ufc/mL.

As placas de 96 poços foram inicialmente preenchidas com 100 µL de caldo *Mueller Hinton* (MH) em todos poços. Em seguida, foi adicionado 100 µL do composto na primeira coluna da placa e realizado diluição seriada, homogeneizando e levando 100 µL da coluna 1 para a coluna 2, homogeneizando novamente e retirando 100 µL da coluna 2 para a coluna 3 e assim sucessivamente até a coluna 10. Posteriormente, 100 µL da coluna 10 foi transferido para a coluna 12, que corresponde ao controle de esterilidade. Logo após, 100 µL

de inóculo bacteriano preparado anteriormente foi adicionado a cada poço da coluna 1 até a 11. A coluna 11 foi utilizada para controle de crescimento, contendo apenas MH e inóculo bacteriano. O intervalo de concentração final da prometazina (Cristalia) foi de 12,20 - 6.250 $\mu\text{g/mL}$, da deferiprona (Sigma-Aldrich) foi de 2-1024 $\mu\text{g/mL}$ e do mel de Manuka (Comvita UMF 10 +) foi de 0,078125 - 40%, p/v. A Figura 8 pode ser observada para melhor entendimento da técnica.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas e a leitura foi feita de forma visual a fim de encontrar a CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e a droga antimicrobiana ciprofloxacina permitiram validar o experimento.

Figura 8 - Desenho esquemático para o teste de sensibilidade.



Fonte: AMANDO, B. R., 2018.

4.3 Avaliação do efeito *in vitro* da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre os biofilmes maduros de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Para avaliação do efeito *in vitro* da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre biofilmes maduros de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o crescimento de biofilmes foi inicialmente induzido em placas de 96 poços de fundo chato, em um volume total de 200 μL . Foi utilizado caldo BHI acrescido de glicose 1% (175 μL) e inóculo bacteriano (25 μL) numa turvação de 6 na escala de McFarland, equivalente a $1,8 \times 10^9$ ufc/mL, feito com cepas previamente crescidas por 24 horas em ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa

bacteriológica a 37 °C, por 48 horas, para formação do biofilme. Após essa etapa, todos os poços foram lavados cuidadosamente com PBS 1x. Em seguida, foram adicionados 200 µL dos compostos em 10 concentrações seriadas: prometazina (12,20 - 6250 µg/mL), deferiprona (2 - 1024 µg/mL) ou mel de Manuka (0,078125 - 40%, p/v). Posteriormente, as placas foram incubadas novamente em estufa bacteriológica a 37 °C, por mais 24 horas (SIDRIM *et al.*, 2019).

A leitura da atividade metabólica foi feita de forma visual com o indicador metabólico resazurina a 0,025% e a CEMB foi considerada a menor concentração onde não se observa atividade metabólica celular. Além disso, as placas foram avaliadas quanto à biomassa dos biofilmes, por meio da técnica de coloração com cristal violeta e leitura com espectrofotômetro para medir a densidade óptica a um comprimento de onda de 490 nm (SIDRIM *et al.*, 2019). Os testes foram realizados em duplicata, em dois momentos distintos. Poços livres de droga foram utilizados como controle de crescimento, enquanto que poços contendo somente meio de cultura foram utilizados como controle de esterilidade.

4.4 Obtenção, processamento, desinfecção da pele porcina e formação da ferida

A pele porcina foi obtida de um abatedouro regulamentado, na cidade de Fortaleza, Ceará, e congelada até a realização do experimento (GUEDES *et al.*, 2021). Após descongelada, foi cortada em fragmentos de 2x2 cm, com uso de bisturi e desinfetada seguindo a metodologia descrita por Yang *et al.*, (2013), onde os fragmentos foram colocados com o auxílio de uma pinça estéril por 30 minutos em um frasco estéril contendo 50 mL de álcool etílico 70%. Em seguida, transferidos para um frasco estéril contendo 50 mL de hipoclorito de sódio 0,615% por 30 minutos. E por fim, em um frasco estéril contendo 50 mL de água destilada por mais 30 minutos. Logo após a desinfecção, foram colocados em uma placa de Petri estéril para secarem, por aproximadamente 30 minutos em capela de fluxo laminar, a temperatura ambiente. Para formação da ferida, foi utilizado o punch número 8 para delimitação das dimensões (BRACKMAN *et al.*, 2016), que foi introduzido até a derme e com o auxílio de um bisturi o tecido demarcado foi retirado. A Figura 9 apresenta um fragmento de pele após a formação da ferida.

Figura 9 - Fragmento de pele após confecção da ferida.

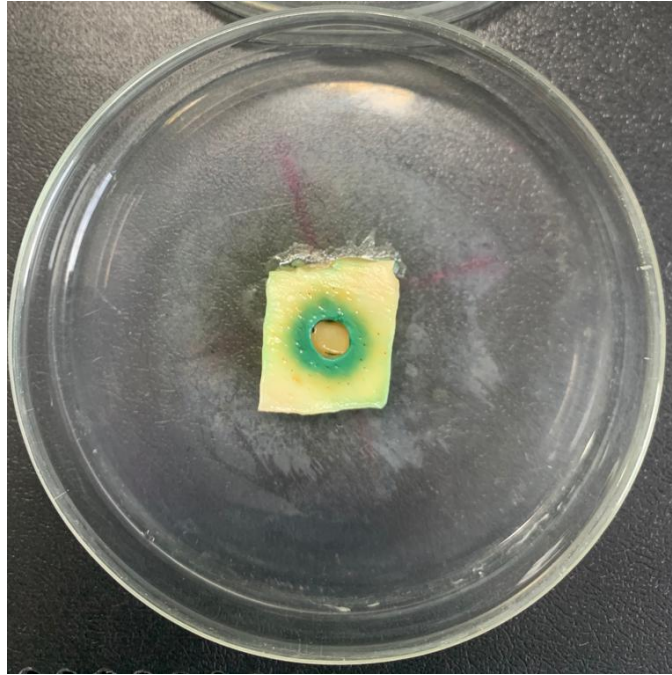


Fonte: Arquivo pessoal.

4.5 Formação do biofilme na ferida e avaliação da ação de prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre os biofilmes maduros formados em modelos *ex vivo*

Os biofilmes foram montados na pele porcina utilizando a metodologia de Guedes *et al.*, (2021), com algumas modificações. Os microrganismos foram semeados em ágar BHI e incubados a 37 °C um dia antes do experimento para crescimento das colônias. Os fragmentos de pele foram colocados individualmente em placas de Petri contendo ágar bacteriológico a 7 g/L. Os inóculos bacterianos de duas cepas de *S. aureus* e duas de *P. aeruginosa* foram preparados na escala 6 de McFarland com caldo BHI 1% de glicose e, posteriormente, 25 µL de inóculo bacteriano foram adicionados em cada ferida. Em seguida, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37 °C, por 72 horas. A Figura 10 traz um fragmento de pele após formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

Figura 10 - Fragmento de pele após formação de biofilme.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após esse período, para avaliar o efeito da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre o biofilme *ex vivo*, cada ferida foi preenchida com gaze estéril de 1 cm² embebida com 100 µL de cada composto. A prometazina nas duas espécies foi testada nas concentrações de CEMB (195,3125 µg/mL para *S. aureus* ATCC; 390,625 µg/mL para *S. aureus* MRSA; 781,25 µg/mL para *P. aeruginosa* ATCC e 781,25 µg/mL para a cepa MDR de *P. aeruginosa*) e 2x CEMB. A deferiprona para *P. aeruginosa* foi utilizada nas concentrações de CEMB (512 µg/mL) e 2x CEMB (1024 µg/mL) e para *S. aureus*, como não foi encontrado CEMB, foi utilizado nas duas maiores concentrações (512 e 1024 µg/mL). Como também não houve CEMB para o mel de Manuka, foi testado nas duas maiores concentrações, 20 e 40% (p/v). Soro Fisiológico (SF) a 0,9% foi utilizado como controle de crescimento. As placas de Petri, contendo os fragmentos de pele, foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, em dois momentos diferentes.

Após incubação, a gaze de cada ferida foi retirada com pinça flambada, foram adicionados 50 µL de SF a 0,9% no leito da ferida. Em seguida, pequenos cortes perpendiculares foram feitos para romper o biofilme e os 50 µL de SF a 0,9% foram aspirados e descartados. Posteriormente, foi empregado a técnica de Levine e colaboradores (1976), sendo um *swab* introduzido em cada ferida, rotacionado duas vezes em 360° e transferido

para tubos contendo 1 mL de Tween 20 (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Os tubos foram agitados em vortex, por um minuto, e 100 μL de cada suspensão foram submetidos a uma diluição seriada em solução salina estéril de 1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000 e 1:100.000. Em seguida, 10 μL das diluições 1:10.000 e 1:100.000 foram semeados, em duplicata, em ágar MH e incubados a 37° C por 24 h para a contagem de ufc.

4.6 Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em modelo *ex vivo* de feridas

Para a análise da arquitetura dos biofilmes *ex vivo*, os biofilmes das cepas ATCC foram crescidos sobre os fragmentos de pele e, após serem tratados com prometazina, deferiprona ou mel de Manuka nas concentrações que se mostraram mais efetivas nas contagens de ufc a partir do *ex vivo*, foram corados com FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability®, contendo SYTO9 e iodeto de propídio. Os fragmentos de pele foram avaliados sob microscópio confocal Nikon C2, a 488 nm, para detecção de SYTO9, que identifica células vivas, e a 561 nm, para a detecção do iodeto de propídio, que identifica células mortas ou danificadas. Imagens tridimensionais foram adquiridas de 10 campos por pele analisada, com a câmera Nikon Eclipse Ti e processadas com o software NIS elements AR. A análise das imagens foi realizada com o software COMSTAT2, associado ao ImageJ 1.5i, utilizando o filtro para células vivas, coradas com SYTO9, para quantificar biomassa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura média da área total (μm), espessura média da biomassa (μm), coeficiente de rugosidade e relação área-volume ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) (GUEDES *et al.*, 2021).

4.7 Análise estatística

Inicialmente, os dados obtidos foram analisados quanto ao padrão de normalidade. Para os que apresentavam distribuição normal, foi utilizado teste t para amostras não pareadas, enquanto os dados não paramétricos foram avaliados com o teste de Mann-Whitney. O programa GraphPad Prism 9.0 foi utilizado para as análises e valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) da prometazina, deferiprona e mel de Manuka contra os isolados de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

As CIMs encontradas variaram de 97,66 - 195,31 µg/mL e 390,62 - 781,25 µg/mL para prometazina contra as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. No intervalo de concentração testado, as CIMs de deferiprona foram encontradas apenas contra 2/8 cepas de *S. aureus*, com valor de 512 µg/mL, enquanto contra cepas de *P. aeruginosa*, foram encontradas CIMs de deferiprona contra 7/8 cepas, variando de 512 a 1024 µg/mL. O mel de Manuka apresentou CIM na concentração de 10% contra todos os isolados de *S. aureus*, e CIMs variando de 20 a 40% contra *P. aeruginosa* (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Eliminatória Mínima sobre o biofilme (CEMB) da prometazina, deferiprona e mel de Manuka contra biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. * indica as cepas utilizadas no modelo *ex vivo*.

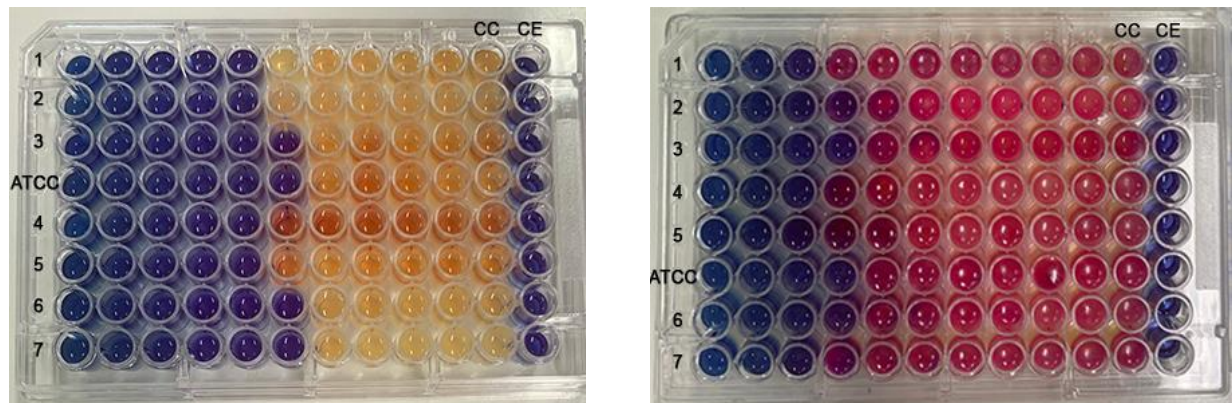
Cepas	Prometazina (µg/mL)		Deferiprona (µg/mL)		Mel de Manuka (% p/v)	
	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB
<i>S. aureus</i> 1	195,31	390,62	>1024	>1024	10	>40
<i>S. aureus</i> 2	195,31	390,62	>1024	>1024	10	>40
<i>S. aureus</i> 3	97,66	195,31	>1024	>1024	10	>40
<i>S. aureus</i> 4 (MRSA)	97,66	390,62	>1024	>1024	10	>40
<i>S. aureus</i> 5 (MRSA)*	195,31	390,62	>1024	>1024	10	>40
<i>S. aureus</i> 6 (MRSA)	97,66	195,31	>1024	>1024	10	>40
<i>S. aureus</i> 7 (MRSA)	97,66	195,31	512	>1024	10	>40
<i>S. aureus</i> ATCC*	97,66	195,31	512	>1024	10	20
<i>P. aeruginosa</i> 1 (MDR)	390,62	1562,5	512	>1024	40	>40
<i>P. aeruginosa</i> 2	390,62	1562,5	1024	>1024	40	>40
<i>P. aeruginosa</i> 3	390,62	781,25	1024	1024	40	>40
<i>P. aeruginosa</i> 4	390,62	1562,5	512	>1024	20	>40
<i>P. aeruginosa</i> 5 (MDR)	781,25	1562,5	1024	>1024	40	>40
<i>P. aeruginosa</i> 6 (MDR)	390,62	1562,5	>1024	1024	40	>40
<i>P. aeruginosa</i> 7 (MDR)*	390,62	1562,5	512	1024	40	>40
<i>P. aeruginosa</i> ATCC*	390,62	781,25	512	1024	40	>40

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Efeito da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre os biofilmes maduros de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Quanto ao efeito sobre biofilmes maduros, as CEMBs da prometazina foram entre 195,31 e 390,62 $\mu\text{g/mL}$ contra as cepas de *S. aureus* e de 781,25 a 1562,5 $\mu\text{g/mL}$ contra as de *P. aeruginosa* (Figura 11). No intervalo de concentração testado, não foram encontrados CEMBs para deferiprona contra isolados de *S. aureus* e quatro isolados de *P. aeruginosa*, enquanto a CEMB de deferiprona contra os outros quatro isolados de *P. aeruginosa* foi de 1024 $\mu\text{g/mL}$. O mel de Manuka, por sua vez, na faixa de concentração testada, apresentou CEMB apenas contra *S. aureus* ATCC, na concentração de 20% (Tabela 1).

Figura 11 - Placas de microdiluição evidenciando a atividade metabólica celular após exposição à prometazina. À esquerda, placa contendo as cepas de *S. aureus* e à direita, as de *P. aeruginosa*. A resazurina mantém sua cor azul nos poços onde não há viabilidade celular e na presença de metabolismo celular, é reduzida em resorufina, alterando sua cor original.



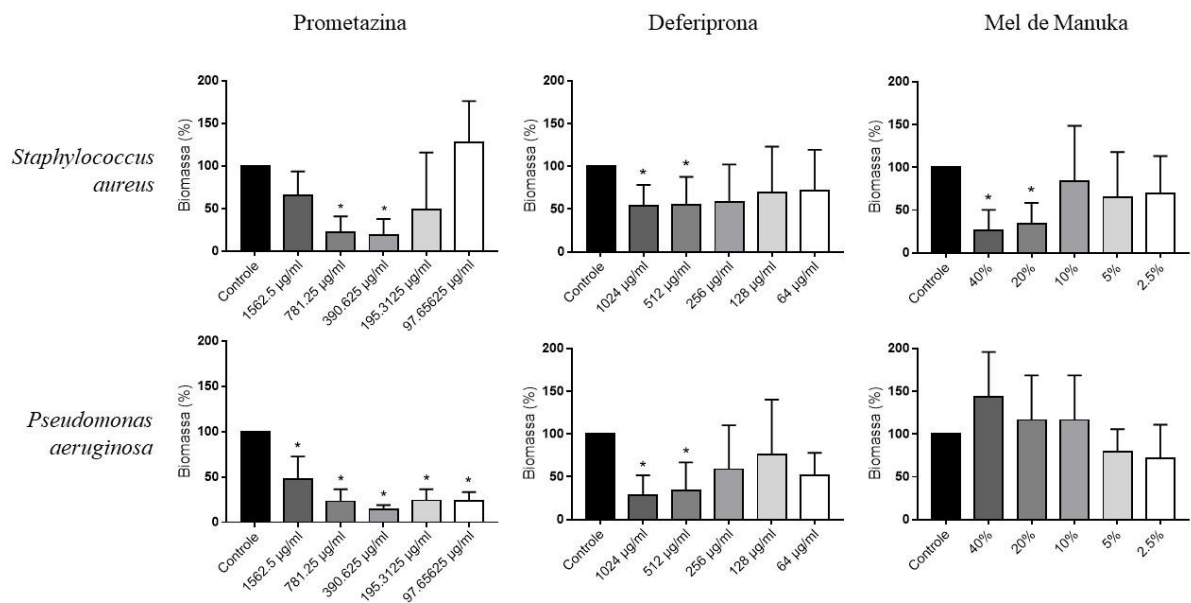
Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à quantificação da biomassa dos biofilmes maduros expostos à prometazina, *S. aureus* apresentou redução significativa de 80,71% ($P=0,0009$) na concentração de 390,62 $\mu\text{g/mL}$ e de 77,77% ($P=0,0009$) a 781,25 $\mu\text{g/mL}$. Contra *P. aeruginosa*, a prometazina causou uma redução significativa na biomassa de 76,66% ($P=0,0015$), 75,85% ($P=0,0017$), 86,31% ($P=0,0003$), 76,86% ($P=0,0014$) e 52,17% ($P=0,0481$) nas respectivas concentrações de 97,66 $\mu\text{g/mL}$, 195,31 $\mu\text{g/mL}$, 390,62 $\mu\text{g/mL}$, 781,25 $\mu\text{g/mL}$ e 1562,5 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1).

Já deferiprona reduziu significativamente a biomassa nas concentrações de 512 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*, 45,29% ($P=0,0306$) e 46,13% ($P=0,0173$), respectivamente, e

para *P. aeruginosa*, 66,02% (P=0,0078) e 71,94% (P=0,0047). No que concerne ao mel de Manuka, houve uma diminuição significativa da biomassa apenas para *S. aureus*, uma redução respectiva de 66,43% (P=0,0205) e 74,11% (P=0,0084) em 20 e 40% (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Efeito da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre biofilmes maduros de *S. aureus* (n=8) e *P. aeruginosa* (n=8). Dados expressos em porcentagem, com média e desvio padrão da absorbância da biomassa mensurada por meio da técnica de cristal violeta. * indica diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle de crescimento.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Efeito da prometazina, deferiprona e mel de Manuka sobre biofilmes em modelo *ex vivo* de feridas

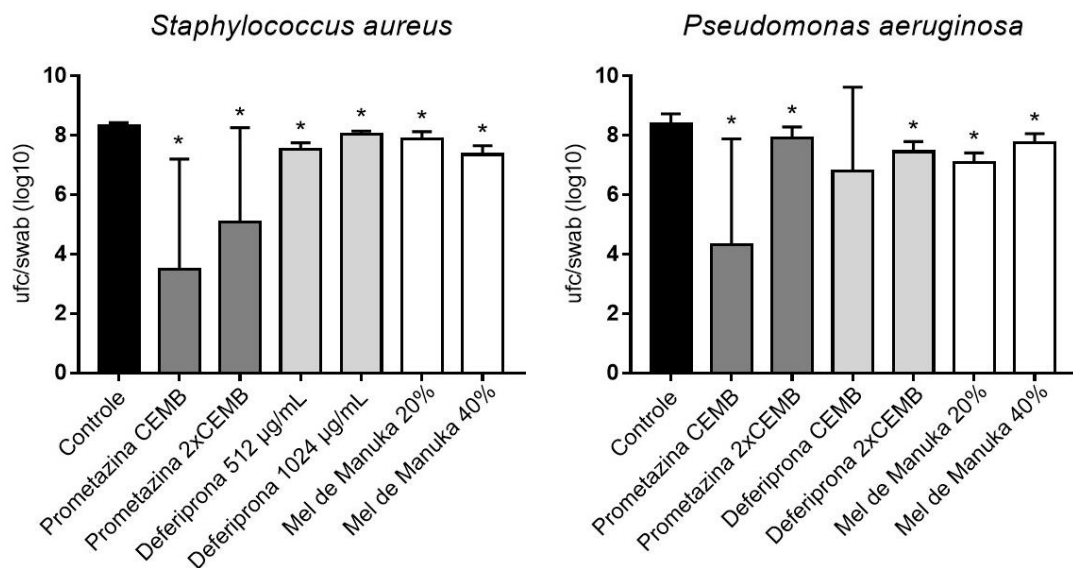
Os três compostos testados reduziram significativamente (P<0,05) as contagens de ufc/swab de biofilmes cultivados em pele porcina nas duas espécies bacterianas (Gráfico 2). A prometazina nas concentrações de CEMB e 2x CEMB reduziu em média 4,83 log (P=0,0002) e 3,23 log (P=0,0123), respectivamente, as contagens de ufc de biofilmes de *S. aureus* e em 4,09 log (P=0,0061) e 0,51 log (P=0,0138) as contagens de ufc de biofilmes de *P. aeruginosa*.

Em relação à deferiprona, houve redução de 0,79 log (P<0,0001) a 512 µg/mL e de 0,28 log (P=0,0002) a 1024 µg/mL na contagem de ufc/swab de *S. aureus* e de 0,96 log (P<0,0001) para biofilmes de *P. aeruginosa* em 2xCEMB. Quanto ao mel de Manuka, reduziu

a contagem de ufc/swab de biofilmes em 0,52 log ($P=0,0006$), na concentração de 20% e de 0,46 log ($P<0,0001$) a 40% para *S. aureus* e em 1,31 log ($P=0,0002$) a 20% e 0,66 log ($P=0,0011$) a 40% para *P. aeruginosa*.

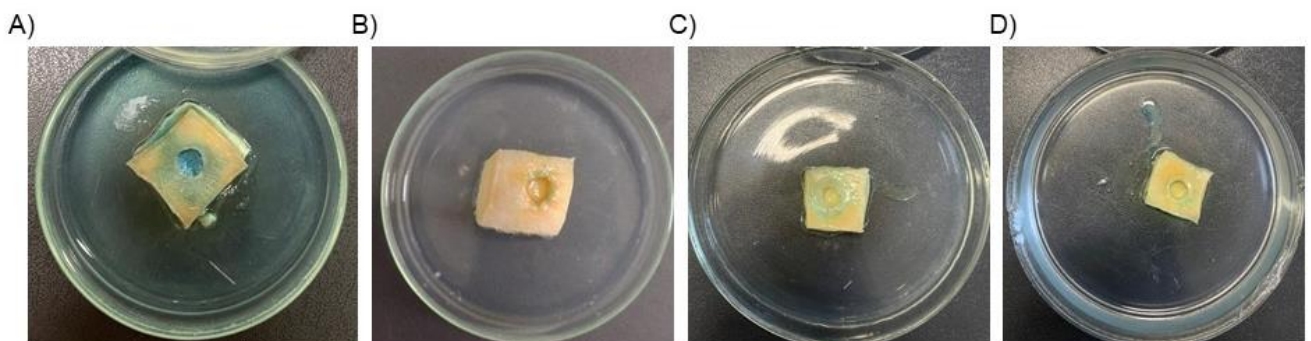
Na Figura 12 podemos encontrar fragmentos de pele após o tratamento dos biofilmes de *P. aeruginosa* com SF 0,9%, prometazina, deferiprona e mel de Manuka.

Gráfico 2 - Contagem de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *S. aureus* ($n=2$) e *P. aeruginosa* ($n=2$) cultivados em modelo *ex vivo* de feridas após exposição à prometazina, deferiprona e mel de Manuka. Dados expressos em log10, com média e desvio padrão. * indica diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle de crescimento.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 12 - Fragmentos de pele após tratamento. A) SF 0,9%; B) Prometazina; C) Deferiprona; D) Mel de Manuka.



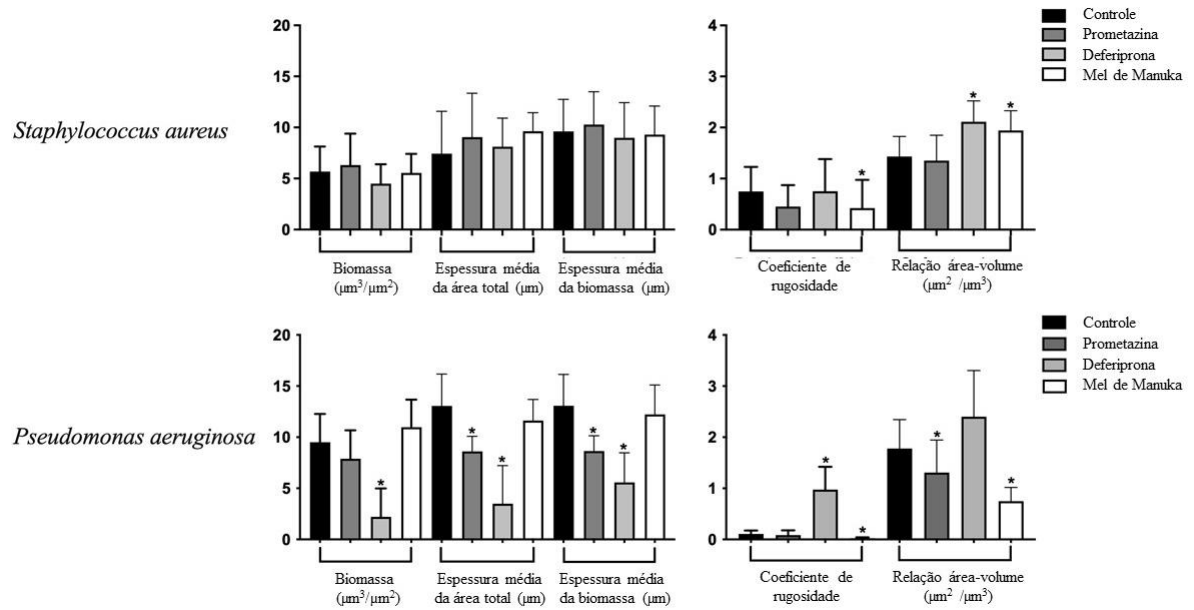
Fonte: Arquivo pessoal.

5.4 Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em modelo *ex vivo* de feridas

As análises das imagens por microscopia confocal mostraram que a prometazina não alterou a arquitetura de biofilmes de *S. aureus* cultivados *ex vivo*. Por sua vez, a deferiprona e o mel de Manuka aumentaram significativamente a relação área-volume de biofilmes de *S. aureus* cultivados *ex vivo* ($P=0,0005$ e $P=0,0147$ respectivamente). Além disso, o mel de Manuka foi capaz de reduzir o coeficiente de rugosidade ($P=0,0366$). Quanto aos biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados em modelo *ex vivo*, os três compostos foram capazes de alterar a sua estrutura (Gráfico 3; Figura 13).

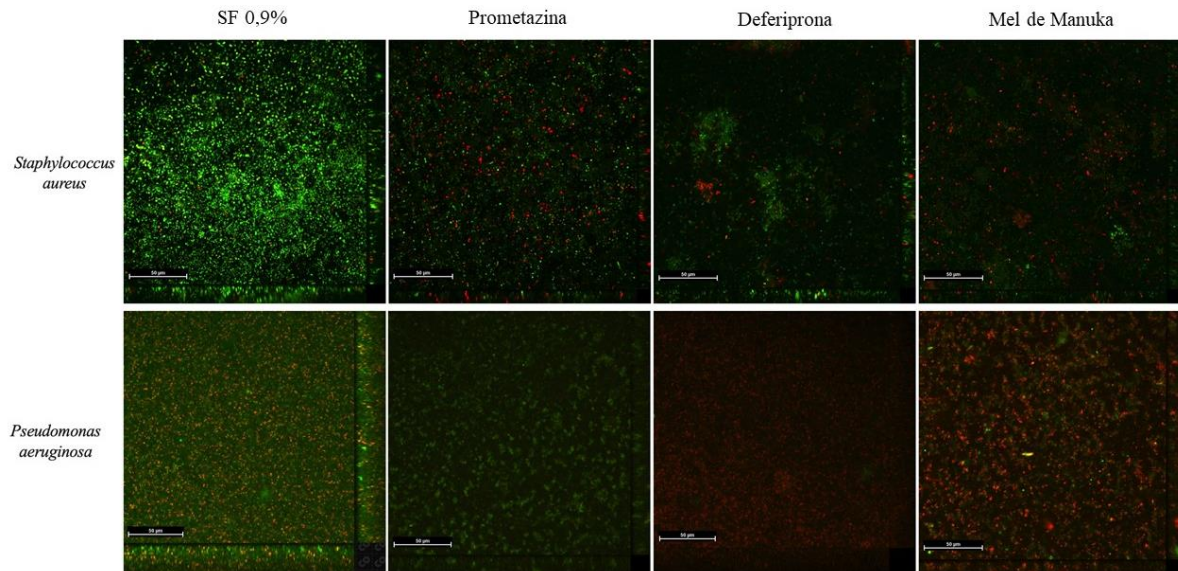
A prometazina reduziu a espessura média da área total ($P=0,007$), a espessura média da biomassa ($P=0,0009$) e relação área-volume ($P=0,0284$) dos biofilmes de *P. aeruginosa*, quando comparados aos do controle de crescimento (solução salina). A deferiprona, por sua vez, reduziu significativamente a biomassa ($P=0,0005$), a espessura média da área total ($P<0,0001$) e a espessura média da biomassa ($P<0,0001$), e aumentou o coeficiente de rugosidade ($P=0,0004$) de biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados *ex vivo*. Em relação ao mel de Manuka, reduziu o coeficiente de rugosidade ($P=0,0016$) e a relação área-volume ($P=0,0005$) dos biofilmes de *P. aeruginosa*, quando comparados aos do controle de crescimento (solução salina) (Gráfico 3; Figura 13).

Gráfico 3 - Análise da microscopia confocal de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em modelo *ex vivo* de feridas em pele porcina. As imagens Z-stack foram adquiridas de 10 campos diferentes e analisadas com o software COMSTAT2™, usando laser de 488 nm, que revela células vivas, coradas com SYTO9. * indica diferenças estatisticamente significativas ($P<0,05$) entre biofilmes expostos a prometazina, deferiprona ou mel de Manuka e controle de crescimento (solução salina).



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13 - Microscopia confocal dos biofilmes bacterianos em modelo *ex vivo* após o tratamento com SF 0,9%, prometazina (195,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus* e 781,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *P. aeruginosa*), deferiprona (512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus* e 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *P. aeruginosa*) e mel de Manuka (40% para *S. aureus* e 20% para *P. aeruginosa*). Quando coradas em verde, as células estão viáveis, quando em vermelho, as células tiveram sua parede danificada.



Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

A infecção é considerada um obstáculo no processo de regeneração tecidual, sobretudo quando os microrganismos estão na forma de biofilmes, por conferirem uma maior resistência ao estresse ambiental, aos antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro. A presença de biofilme em feridas crônicas é considerada um desafio na clínica (ZHAO *et al.*, 2013).

Nesta pesquisa, trabalhamos com cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, por serem consideradas respectivamente as bactérias Gram positiva e Gram negativa mais isoladas de lesões crônicas (GONZALEZ *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2021; NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018; SEN, 2019). E, como possíveis alternativas terapêuticas foram testados a prometazina, a deferiprona e o mel de Manuka, que têm sido descritos com atividade antibiofilme na literatura (SIDRIM *et al.*, 2017; RICHTER *et al.*, 2017; SHIRLAW *et al.*, 2020).

A prometazina, um fármaco amplamente utilizado na clínica como anti-histamínico, apresentou efeito antimicrobiano frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* na forma planctônica e em biofilme *in vitro*, bem como reduziu as contagens de ufc em modelo *ex vivo* de feridas. Além disso, a prometazina também reduziu a espessura dos biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados em modelo *ex vivo*, como demonstrado pelas análises de microscopia confocal.

Os resultados encontrados das cepas em sua forma planctônica corroboram com os achados de Akinjogunla *et al.*, (2021), que encontraram atividade antibacteriana da prometazina contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, dentre outros microrganismos Gram positivos e negativos. Os autores relatam a atividade desse composto como inibidor de bomba de efluxo, além de ser capaz de afetar ATPases e dificultar processos de transcrição e tradução do DNA através da inserção de moléculas de prometazina em sítios do DNA bacteriano, associado ao aumento da permeabilidade ao composto na célula bacteriana.

Lehtinen e Lilius (2007) discorrem que, devido a esse aumento da permeabilidade, a prometazina pode funcionar como um adjuvante que permite o influxo e a permanência dos antimicrobianos clássicos em microrganismos que apresentam sua resistência antimicrobiana mediada por bombas de efluxo. Além disso, a prometazina demonstrou desestruturar os biofilmes microbianos, possivelmente por inibir a atividade da bomba de efluxo (BRILHANTE *et al.*, 2020; SIDRIM *et al.*, 2017).

Gajdacs *et al.* (2019) sugeriram que o efeito antibiofilme pode estar relacionado à inibição de moléculas de QS, possivelmente por inibir a detecção de sinal ou modificar a expressão gênica.

Embora a atividade antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* da prometazina tenha sido descrita, esse fármaco ainda não é utilizado para o tratamento de feridas. Pesquisas acerca da utilização da prometazina para o manejo de feridas ainda são escassas, trabalhos que elucidem melhor a atuação desse composto em outros modelos, como *ex vivo* e *in vivo*, permitirão maiores discussões acerca de sua aplicabilidade na clínica.

No presente estudo, a prometazina mostrou efeitos antimicrobiano e antibiofilme contra as duas espécies bacterianas mais relevantes no contexto de infecções de feridas em concentrações abaixo de 2 g, uma concentração que já é usada topicamente, em creme, para o tratamento de condições alérgicas e queimaduras (CANTISANI *et al.* 2013). Apesar de algumas contraindicações e reações adversas descritas para o seu uso tópico, a avaliação de diferentes formulações, inclusive em concentrações ainda mais baixas do que as disponíveis no mercado, sugere que a prometazina pode representar uma alternativa terapêutica promissora no tratamento de feridas associadas a biofilmes.

A deferiprona, fármaco utilizado no tratamento de talassemia, é capaz de privar os microrganismos de ferro, interferindo assim em vias metabólicas essenciais para sua sobrevivência. Neste estudo, embora a deferiprona não tenha apresentado uma notável atividade antimicrobiana e antibiofilme *in vitro*, ela reduziu as contagens de ufc de biofilmes cultivados *ex vivo*. Sua atividade foi mais relevante contra *P. aeruginosa* do que *S. aureus*, alterando a arquitetura de biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados *ex vivo*, como demonstrado pelas análises de microscopia confocal. Esses biofilmes foram mais finos e menos robustos que os do controle de crescimento, pois apresentaram menor biomassa, espessura média da área total e espessura média da biomassa e maior coeficiente de rugosidade, após exposição à deferiprona.

Pseudomonas aeruginosa possui uma alta demanda de ferro (REINHART; OGLESBY-SHERROUSE, 2016). A diversidade de mecanismos usados por esse patógeno para absorver ferro, como a produção de sideróforos endógenos, a presença de vários receptores para sideróforos e o uso de quelantes exógenos, destaca a importância desse íon para o metabolismo dessa espécie (VISCA *et al.*, 2013). Esses mecanismos de captação de ferro facilitam sua versatilidade como patógeno e influenciam a virulência desse microrganismo (REINHART; OGLESBY-SHERROUSE, 2016). Além disso, bactérias Gram positivas e Gram negativas produzem sideróforos com diferentes mecanismos de captação de

ferro. No entanto, antibióticos que mimetizam sideróforos parecem ser mais eficazes contra bactérias Gram negativas (RIBEIRO; SOUSA; SIMÕES, 2022). Assim, hipotetiza-se que um patógeno com um arsenal menor de estratégias de captação de ferro do que *P. aeruginosa*, como *S. aureus*, é menos afetado pela limitação de ferro, o que pode corroborar com os resultados obtidos.

Além disso, a importância do ferro para os biofilmes de *P. aeruginosa* está bem descrita em outros estudos (YU *et al.*, 2016; KANG; KIRIENKO, 2018). Kang e Kirienko (2018) relatam que a privação de ferro compromete a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, indicando a relevância desse íon para esse processo. Yu *et al.* (2016) descrevem que um componente importante da matriz do biofilme, o exopolissacarídeo Psl, tem sua produção estimulada em ambientes com altas concentrações de ferro, estimulando a formação de biofilmes. Assim, acredita-se que o uso de deferiprona e a consequente privação de ferro para *P. aeruginosa* podem explicar os melhores resultados desse composto contra os biofilmes desse patógeno.

Embora os resultados apresentados aqui tenham menor eficácia contra cepas de *S. aureus*, esse fármaco já foi utilizado *in vitro* em associação com hidrogel contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, apresentando efeito significativo contra biofilmes, principalmente quando associado à ciprofloxacina (RICHTER *et al.*, 2017). Esse composto também apresentou efeito antibiofilme *in vivo* contra biofilmes de *S. aureus*, além de ser um medicamento seguro para uso em mucosas (OOI *et al.*, 2018).

Mohammadpour *et al.* (2013) utilizaram deferiprona tópica em concentrações de 3, 6 e 9 g, muito mais altas do que as concentrações usadas nesta pesquisa, e, além de não observarem efeitos adversos, demonstraram que essa droga acelerou significativamente a cicatrização de feridas em ratos. Os autores descrevem que, ao eliminar o ferro, muitos radicais livres não são mais formados no leito da ferida, o que impede o estresse oxidativo na região e permite uma melhor cicatrização.

Assim, a segurança do uso tópico da deferiprona em concentrações mais altas do que as utilizadas nesta pesquisa permite levantar a hipótese de que efeitos antimicrobianos mais pronunciados contra as espécies bacterianas deste estudo podem ser encontrados se as concentrações às quais esses patógenos são expostos forem aumentadas. Além disso, a perspectiva de melhorar o processo de cicatrização por meio da redução do estresse oxidativo associado à redução da carga microbiana na ferida gera perspectivas alentadoras que precisam ser melhor elucidadas em estudos futuros.

Em relação ao mel de Manuka, foi capaz de inibir o crescimento planctônico *in vitro* de ambas as espécies bacterianas e reduziu as contagens de ufc de biofilmes cultivados *ex vivo*, apesar de aumentar a robustez dos biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados *ex vivo*, como demonstrado pelo menor coeficiente de rugosidade do que o obtido para o controle de crescimento.

A atividade antimicrobiana do mel de Manuka é devido à sua alta concentração de MGO combinada com outras características, como o alto teor de açúcar, baixo pH, formação de peróxido de hidrogênio, a presença do peptídeo antibacteriano derivado das abelhas, a defensina-1, e o glicosídeo leptosina (BOUZO *et al.* 2020, GOSLINSKI *et al.* 2021). Isoladamente, o MGO causa lise na célula bacteriana, além de inibir processos como flagelação e divisão celular (GIRMA *et al.* 2019).

Johnston *et al.* (2018) descrevem que *Bacillus subtilis* e *S. aureus*, quando expostos a concentrações de mel de 4%, produziram células menores e cromossomos condensados, indicando que sua ação sobre esses patógenos Gram positivos pode estar associada ao comprometimento do processo de divisão celular.

Os menores valores de CIM observados para *S. aureus* em comparação com *P. aeruginosa* corroboram o que já foi relatado. Stavropoulou *et al.* (2022) descrevem que o efeito antimicrobiano do mel de Manuka é melhor caracterizado para microrganismos Gram positivos, em particular para *S. aureus*, além de destacar que o efeito deste composto é menos potente em bactérias Gram negativas.

A atividade antibiofilme do mel de Manuka contra *S. aureus* já é demonstrada por outros estudos (LU *et al.* 2014, LIU *et al.* 2018) e pode envolver a regulação negativa de genes associados à biossíntese de proteínas relacionadas à adesão do biofilme (KOT *et al.* 2020).

Para *P. aeruginosa*, os achados sobre a atividade antibiofilme corroboram os de Lu *et al.* (2019), que relataram a inibição do crescimento do biofilme de *P. aeruginosa* usando mel de Manuka, reduzindo a biomassa do biofilme em 32%. Shirlaw *et al.* (2020) relataram que alguns de seus constituintes, especificamente o ácido benzóico e o MGO, ligam-se eficientemente a uma enzima estrutural importante de *P. aeruginosa*, PaDsbA1, que é necessária para a síntese de exoenzimas como a elastase, contribuindo para a virulência de *P. aeruginosa*. Assim, sugere-se que essa ligação também possa contribuir para a redução da formação do biofilme de *P. aeruginosa*.

Alguns pesquisadores têm destacado o efeito desse mel no tratamento de feridas, sendo suas propriedades antimicrobianas, fator chave para este processo (YAGHOUBI;

KAZEROUNI; KAZEROUNI, 2013; WHITE, 2016). No entanto, não há consenso sobre a concentração de mel de Manuka para obter um efeito antimicrobiano *in vivo*.

Assim, foi evidenciado que a prometazina, a deferiprona e o mel de Manuka foram capazes de diminuir as contagens de unidades formadoras de colônias e afetar a estrutura do biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, o estudo de biofilmes em feridas é desafiador, e os modelos utilizados aqui têm algumas limitações.

Embora amplamente utilizados, o modelo *in vitro* pode não refletir como os microrganismos crescem e se desenvolvem em uma superfície biótica, e não mimetiza o ambiente da ferida. Logo, algumas dessas limitações são resolvidas pelo uso de um modelo *ex vivo*, mas outras variáveis importantes não podem ser avaliadas, como a interação entre a comunidade microbiana e o hospedeiro, o contexto clínico do hospedeiro e os parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos dos compostos no local da infecção. Portanto, essas questões podem ser abordadas em estudos adicionais *in vivo*.

7 CONCLUSÃO

A presença de biofilmes no leito da ferida está envolvida no retardo do processo fisiológico de cicatrização, exigindo uma intervenção direcionada. Neste estudo, avaliamos a atividade antimicrobiana de prometazina, deferiprona e mel de Manuka *in vitro* e em modelo *ex vivo* de feridas associadas a biofilme contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nossos resultados mostraram que os três compostos têm propriedades antimicrobianas *in vitro*, mas foram eficazes contra biofilmes cultivados em modelo de ferida *ex vivo*, mostrando seu potencial uso no manejo de feridas associadas a biofilme. Estudos adicionais são necessários para validar a prometazina, a deferiprona e o mel de Manuka como agentes antibiofilme para o tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, K.; CHAUHAN, N. Pressure ulcers: back to the basics. **Indian Journal of Plastic Surgery**, [S.L.], v. 45, n. 02, p. 244-254, maio 2012. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.4103/0970-0358.101287>.
- AKINJOGUNLA, O. J.; UMO, A. N.; ALOZIE, M. F.; OSHOSANYA, G. O.; SATURDAY, G. I. Antibacterial activity and time kill kinetics of Amlodipine, Thioridazine and Promethazine against pathogenic clinical bacterial isolates. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v. 22, n. 3, 2021.
- ALVES, P. J.; BARRETO, R. T.; BARROIS, B. M.; GRYSON, L. G.; MEAUME, S.; MONSTREY, S. J. Update on the role of antiseptics in the management of chronic wounds with critical colonisation and/or biofilm. **International Wound Journal**, v.18, n.3, p.342-358, 2021.
- AMANDO, B. R. **Impregnação de cateteres urinários com moduladores de *quorum sensing* e inibidor de bombas de efluxo para inibição de biofilmes bacterianos associados a infecção do trato urinário**. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- AMMENDOLA, S.; SECLI, V.; PACELLO, F.; BORTOLAMI, M.; PANDOLFI, F.; MESSORE, A.; DI SANTO, R.; SCIPIONE, L.; BATTISTONI, A. *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to the Fe chelator deferiprone and to some novel deferiprone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.19, 2021.
- BOROJENY, L. A.; ALBATINEH, A. N.; DEHKORDI, A. H.; GHESHLAGH, R. G. The Incidence of Pressure Ulcers and its Associations in Different Wards of the Hospital: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 11, out. 2020.
- BOUZO, D.; COKCETIN, N. N.; LI, L.; BALLERIN, G.; BOTTOMLEY, A. L.; LAZENBY, J.; WHITCHURCH, C. B.; PAULSEN, I. T.; HASSAN, K. A.; HARRY, E. J. Characterizing the mechanism of action of an ancient antimicrobial, Manuka Honey, against *Pseudomonas aeruginosa* using modern transcriptomics. **mSystems**, v. 5, n.3, 2020.
- BOWERS, S.; FRANCO, E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. **American Family Physician**, v. 101, n. 3, p.159-166, 1 fev. 2020. PMID: 32003952.
- BRACKMAN, G.; COENYE, T. In Vitro and In Vivo Biofilm Wound Models and Their Application. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 897, p. 15-32. 2016.
- BRILHANTE, R. S. N; GOTAY, W. J. P; PEREIRA, V. S; OLIVEIRA, J. S; PEREIRA-NETO, W. A; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M; CORDEIRO, R. A; SIDRIM, J. J. C; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex

species. **Medical Mycology**, v. 58, n. 7, p. 906-912. 2020.
<http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myz140>.

BRITO, A.S.B.; LEITE, F.A.S. Curativos de prata no tratamento de feridas exsudativas - uma revisão sistemática. **Revista Feridas**, v. 09, n. 46, p. 1682-1689. 2021.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: a comprehensive review. **International Journal of Inflammation**, [S.L.], v. 2019, p. 1-15, 2 jun. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/3706315>.

CANTISANI, C.; RICCI, S.; GRIECO, T.; PAOLINO, G.; FAINA, V.; SILVESTRI, E.; CALVIERI, S. Topical Promethazine Side Effects: our experience and review of the literature. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2013, p. 1-9, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/151509>.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; RIELLO, G. B.; VASCONCELOS, D. C.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 600-606. 2016.

CHHABRA, S.; CHHABRA, N.; KAUR, A.; GUPTA, N. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 403-423, dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12663-016-0880-z>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M-100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Standards M02, M07 and M11. 31th ed. CLSI M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2021.

CORAÇA-HUBER, D. C.; DICHTL, S.; STEIXNER, S.; NOGLER, M.; WEISS, G. Iron chelation destabilizes bacterial biofilms and potentiates the antimicrobial activity of antibiotics against coagulase-negative *Staphylococci*. **Pathogens and Disease**, [S.L.], v. 76, n. 5, maio 2018. Oxford University Press (OUP).

CORDEIRO, R.; PORTELA, F. V.; PEREIRA, L. M.; ANDRADE, A. R.; SOUSA, J. K.; AGUIAR, A. L.; PERGENTINO, M. L.; SALES, G.; OLIVEIRA, J. S.; MEDRANO, D. J. Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. **Future Microbiology**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 9-20, jan. 2020. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2019-0186>.

DALISSON, B.; BARRALET, J. Bioinorganics and Wound Healing. **Advanced Healthcare Materials**, [S.L.], v. 8, n. 18, 12 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.201900764>.

DE PAULA, G. F.; NETTO, G. I.; MATTOSO, L. H. C. Physical and Chemical Characterization of Poly(hexamethylene biguanide) Hydrochloride. **Polymers**, v.3, n.2, p.928-941, 2011.

DIAZ-ARTILES, A.; PRIESOL, A. J.; CLARK, T. K.; SHERWOOD, D. P.; OMAN, C. M.; YOUNG, L. R.; KARMALI, F. The Impact of Oral Promethazine on Human Whole-Body

Motion Perceptual Thresholds. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 581-590, 24 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10162-017-0622-z>.

DONNERT, M.; ELSHEIKH, S.; ARCE-RODRIGUEZ, A.; PAWAR, V.; BRAUBACH, P.; JONIGK, D.; HAVERICH, A.; WEISS, S.; MÜSKEN, M.; HÄUSSLER, Susanne. Targeting bioenergetics is key to counteracting the drug-tolerant state of biofilm-grown bacteria. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 16, n. 12, 22 dez. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009126>.

rGAJDÁCS, M; SPENGLER, G. The Role of Drug Repurposing in the Development of Novel Antimicrobial Drugs: Non-Antibiotic Pharmacological Agents as Quorum Sensing-Inhibitors. **Antibiotics** (Basel), v. 8, n. 4, p. 270. 2019.

GIRMA, A.; SEO, W.; SHE, R. C. Antibacterial activity of varying UMF-graded Manuka honeys. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 0224495, 25 out. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0224495>.

GMUR, M. K.; KARPIŃSKI, T. M. Povidone-iodine in wound healing and prevention of wound infections. **Zenodo**, [S.L.], n. 1, p. 12, 23 jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.5281/ZENODO.3958220>.

GONZALEZ, A. C. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A. R. Alves P. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 91, n. 5, p. 614-620, out. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.

GONZÁLEZ, C. V. S.; THUM, M.; RAMALHO, A. O.; SILVA, O. B.; QUEIROZ, W. M. S.; SOUZA, D. M. S. T.; NOGUEIRA, P. C.; SANTOS, V. L. C. G. Análise da “1ª Recomendação Brasileira para o Gerenciamento do Biofilme em Feridas Crônicas e Complexas”. **Estima**, São Paulo, v. 17, ago. 2019.

GOSLINSKI, M.; NOWAK, D.; KLEBUKOWSKA, L. Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 1269-1277, 2021.

GUEDES, G. M. M.; SANTOS-FILHO, A. S. P.; REGIS, W. F. M.; OCADAQUE, C. J.; AMANDO B.R.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; BANDEIRA, S. P.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Ex situ model of biofilm-associated wounds: providing a host-like environment for the study of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219-29, 2010. doi:10.1177/0022034509359125.

GUZMÁN-SOTO, I.; MCTIERNAN, C.; GONZALEZ-GOMEZ, M.; ROSS, A.; GUPTA, K.; SUURONEN, E. J.; MAH, T.; GRIFFITH, M.; ALARCON, E. I. Mimicking biofilm formation and development: recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. **iScience**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 102443, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443>.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: a review of current management and treatments. **Advances in Therapy**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 599-610, 21 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.

HOSNY, A. E. M.; RASMY, S. A.; ABOUL-MAGD, D. S.; KASHEF, M. T.; EL-BAZZA, Z. The increasing threat of silver-resistance in clinical isolates from wounds and burns. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1985–2001. 2019.

HOUSHMANDYAR, S.; EGGLESTON, I. M.; BOLHUIS, A. Biofilm-specific uptake of a 4-pyridone-based iron chelator by *Pseudomonas aeruginosa*. **BioMetals**, v.34, p. 315-328, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-020-00281-x>.

ISHIKAWA, S.; TAKAOKA, S.; ARAI, K.; ICHIOKA, S. Sacral Pressure Ulcer in Leriche Syndrome: a case report. **Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open**, [S.L.], v. 9, n. 11, nov. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/gox.00000000000003971>.

JARBRINK, K.; NI, G.; SONNERGREN, H.; SCHMIDTCHEN, A.; PANG, C.; BAJPAI, R.; CAR, J. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 6, n. 15. 2017.

JÄRBRINK, K.; NI, G.; SÖNNERGREN, H.; SCHMIDTCHEN, A.; PANG, C.; BAJPAI, R.; CAR, J. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 5, n. 1. 2016.

JOHNSTON, M.; MCBRIDE, M.; DAHIYA, D.; OWUSU-APENTEN, R.; NIGAM, P. S. Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 655-664, 2018.

KAISER, P.; WACHTER, J.; WINDBERGS, M. Therapy of infected wounds: overcoming clinical challenges by advanced drug delivery systems. **Drug Delivery and Translational Research**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1545-1567, 20 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-021-00932-7>.

KANG, D.; KIRIENKO, N. V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 7, p. 449-457, 14 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-018-8114-3>.

KANGAL, M. K. O.; REGAN, J. P. Wound Healing. **StatPearls Publishing**, out. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535406/>.

KHANSA, I.; SCHOENBRUNNER, A. R.; KRAFT, C. T.; JANIS, J. E. Silver in Wound Care - Friend or Foe?: a comprehensive review. **Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open**, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 2390, ago. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/gox.00000000000002390>.

KIM, C. M.; SHIN, S. H. Effect of Iron-Chelator Deferiprone on the *In Vitro* Growth of *Staphylococci*. **Journal of Korean Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 289-295, 2009.

KIM, H. Wound Infection. **Archives of Plastic Surgery**, v. 46, n.5, p. 484–485. 2019.

KIM, S.; KANG, S. Anti-Biofilm Activities of Manuka Honey against *Escherichia coli* O157:H7. **Food Science of Animal Resources**, v. 40, n. 4, p. 668–674. 2020.

KITTIPOOM, T.; TANTIWORAWIT, A.; PUNNACHET, T.; HANTRAKUN, N.; PIRIYAKHUNTORN, P.; RATTANATHAMMETHEE, T.; HANTRAKOOL, S.; CHAI-ADISAKSOPHA, C.; RATTARITTAMRONG, E.; NORASETHHADA, L.; FANHCHAKSAI, K.; CHAROENKWAN, P. The Long-Term Efficacy of Deferiprone in Thalassemia Patients with Iron Overload: real-world data from the registry database. **Hemoglobin**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 75-80, 4 mar. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03630269.2022.2072326>.

KOT, B.; SYTYKIEWICZ, H.; SPRAWKA, I.; WITESKA, M. Effect of manuka honey on biofilm-associated genes expression during methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, 2020.

KRAMER, A.; DISSEMOND, J.; KIM, S.; WILLY, C.; MAYER, D.; PAPKE, R.; TUCHMANN, F.; ASSADIAN, O. Consensus on Wound Antisepsis: update 2018. **Skin Pharmacology and Physiology**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 28-58, 21 dez. 2017. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000481545>.

KWIECIŃSKA-PIRÓG, J.; PRZEKWAŚ, J.; MAJKUT, M.; SKOWRON, K.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. Biofilm Formation Reducing Properties of Manuka Honey and Propolis in *Proteus mirabilis* Rods Isolated from Chronic Wounds. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 1823, 19 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8111823>.

LAGADINO, M.; ONISOR, M. O.; RIGAS, A.; MUSETESCU, D. V.; GKENTZI, D.; ASSIMAKOPOULOS, S. F.; PANOS, G.; MARANGOS, M. Antimicrobial properties on non-antibiotic drugs in the Era of increased bacterial resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, 2020. *imuno em feridas*. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8150999/>.

LANGER, V. Pathophysiology, clinical assessment, and investigations involving leg ulcers. **Indian Dermatology Online Journal**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 531, 2014. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2229-5178.142553>.

LEHTINEN J.; LILIUS, E. M. Promethazine renders *Escherichia coli* susceptible to penicillin G: real-time measurement of bacterial susceptibility by fluoro-luminometry. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 1, p. 44-51, 2007.

LEVINE, N.S.; LINDBERG, R.B.; MASON JR, A.D.; PRUITT JR, B.A. The quantitative swab culture and smear: A quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. **J Trauma**. 1976 Feb;16(2):89-94. PMID: 1255833.

LEWIS, K.; PAY, J. L. Wound Irrigation. **StatPearls**, 2021.

LI, Z.; LIN, F.; THALIB, L.; CHABOYER, W. Global prevalence and incidence of pressure injuries in hospitalised adult patients: a systematic review and meta-analysis. **International**

Journal of Nursing Studies, [S.L.], v. 105, p. 103546, maio 2020. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2020.103546>.

LIN, M. H.; SHU, J. C.; HUANG, H. Y.; CHENG, Y. C. Involvement of Iron in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 3, 27 mar. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034388>.

LIMA, G. K. S.; OLIVEIRA, F. T.; BERNARDO, T. H. L.; SANTOS, I. M. R.; FERRO, D. F.; MELO, L. H. A.; AMORIM, H. K.; SILVA, P. S. G. Identificação de microrganismos para controle de infecção em feridas crônicas. **Research Society and Development**, v. 10, n. 8, jul. 2021.

LIPSKY, B. A.; BERENDT, A. R.; CORNIA, P. B.; PILE, J. C.; PETERS, E. J. G.; ARMSTRONG, D. G.; DEERY, H. G.; EMBIL, J. M.; JOSEPH, W. S.; KARCHMER, A. W. Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infectionsa. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 54, n. 12, p. 132-173, 15 jun. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis346>.

LIU, M. Y.; COKCETIN, N. N.; LU, J.; TURNBULL, L.; CARTER, D. A.; WHITCHURCH, C. B.; HARRY, E. J. Rifampicin-Manuka Honey Combinations Are Superior to Other Antibiotic-Manuka Honey Combinations in Eradicating *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, 11 jan. 2018. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02653>.

LU, J.; COKCETIN, N. N.; BURKE, C. M.; TURNBULL, L.; LIU, M.; CARTER, D. A.; WHITCHURCH, C. B.; HARRY, E. J. Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54576-2>.

LU, J.; TURNBULL, L.; BURKE, C. M.; LIU, M.; CARTER, D. A.; SCHLOTHAUER, R. C.; WHITCHURCH, C. B.; HARRY, E. J. Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. **PeerJ**, [S.L.], v. 2, 25 mar. 2014. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.326>.

MALONE, M.; BJARNSHOLT, T.; MCBAIN, A. J.; JAMES, G. A.; STOODLEY, P.; LEAPER, D.; WOLCOTT, R. D. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. **Journal of Wound Care**, v. 26: p. 20-25. 2017.

MARTINENGO, L.; OLSSON, M.; BAJPAI, R.; SOLJAK, M.; UPTON, Z.; SCHMIDTCHEN, A.; CAR, J.; JÄRBRINK, K. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. **Annals of Epidemiology**, [S.L.], v. 29, p. 8-15, jan. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.10.005>.

MERVIS, J. S.; PHILLIPS, T. J. Pressure ulcers: prevention and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 893-902, out. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.068>.

METCALF, D. G.; BOWLER, P. G.; HURLLOW, J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. **Acta Med Croatica**, v. 70, n. 1, p. 73-79, mar. 2014.

MATTOS, I. B.; HOLZER, J. C. J.; TUCA, A. C.; GROEBER-BECKER, F.; FUNK, M.; POPP, D.; MAUTNER, S.; BIRNGRUBER, T.; KAMOLZ, L. P. Uptake of PHMB in a bacterial nanocellulose-based wound dressing: A feasible clinical procedure. **Burns**, v. 45, n. 4, p. 898-904, 2019.

MILLAN, B. S.; GAN, R.; TOWNSEND, P. E. Venous Ulcers: Diagnosis and Treatment. **American family physician**, v. 100, n. 5, p. 298-305. 2019.

MOGHADAM, M. T.; KHOSHBAYAN, A.; CHEGINI, Z.; FARAHANI, I.; SHARIAT, A. Bacteriophages, a New Therapeutic Solution for Inhibiting Multidrug-Resistant Bacteria Causing Wound Infection: Lesson from Animal Models and Clinical Trials. **Drug design, development and therapy**, v. 14, p. 1867-1883. 2020.

MOHAMMADPOUR, M.; BEHJATI, M.; SADEGHI, A.; FASSIHI, A. Wound healing by topical application of antioxidant iron chelators: kojic acid and deferiprone. **International Wound Journal**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 260-264, 24 maio 2013. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-481x.2012.00971.x>.

MORIN, C.; ROUMEGOUS, A.; CARPENTIER, G.; BARBIER-CHASSEFIÈRE, V.; GARRIGUE-ANTAR, L.; CAREDDA, S.; COURTY, J. Modulation of Inflammation by Cicaderma Ointment Accelerates Skin Wound Healing. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S.L.], v. 343, n. 1, p. 115-124, 5 jul. 2012.
<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.111.188599>.

NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL. **Pressure Ulcer Stages Revised**, Washington, 2016; Disponível em: <http://www.npuap.org/about-us>. Acesso em maio 2022.

NEGUT, I.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M. Treatment Strategies for Infected Wounds. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2392. 2018.

NUNAN, R.; KEITH, G. H.; PAUL, M. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1205–1213. 2014.

OCADAQUE, J. C. **Efeito de biossurfactante, de inibidor de bomba de efluxo e de moduladores de quorum sensing sobre a sensibilidade antimicrobiana, a dinâmica de biofilmes e a virulência de *Burkholderia pseudomallei***. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2020.

OLIVER, T. I.; MUTLUOGLU, M. Diabetic Foot Ulcer. **StatPearls**, jan. 2021.

OLSSON, M.; JÄRBRINK, K.; DIVAKAR, U.; BAJPAI, R.; UPTON, Z.; SCHMIDTCHEN, A.; CAR, J. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review. **Wound Repair and Regeneration**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 114-125, 2 dez. 2018. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12683>.

OMAR, A.; WRIGHT, J. B.; SCHULTZ, G.; BURRELL, R.; NADWORNÝ, P. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. **Microorganisms**, v. 5, n. 1, p. 9. 2017.

OOI, M. L.; RICHTER, K.; DRILLING, A. J.; THOMAS, N.; PRESTIDGE, C. A.; JAMES, C.; MORATTI, S.; VREUGDE, S.; PSALTIS, A. J.; WORMALD, P. Safety and Efficacy of Topical Chitogel- Deferiprone-Gallium Protoporphyrin in Sheep Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 9. 2018.

PAZ-DIAS. Ulcera varicosa. 2021. Disponível em: <https://pazdias.pt/ulcera-varicosa/>.

PALUCH, E.; REWAK-SOROCZYNSKA, J.; JEDRUSIK, I.; MAZURKIEWICZ, E.; JERMAKOW, K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 104, n. 5, p. 1871-1881, 11 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>.

POWERS, J. G.; HIGHAM, C.; BROUSSARD, K.; PHILLIPS, T. J. Wound healing and treating wounds. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S.L.], v. 74, n. 4, p. 607-625, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.070>.

PRAKASH, M.; CHANDRAPRABHA, M. N.; RANGARAJAN, A.; WAIKER, P. V.; MURTHY, K. N. C. Challenges in Healing Wound: role of complementary and alternative medicine. **Frontiers in Nutrition**, [S.L.], v. 8, 20 jan. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2021.791899>.

RAFFETTO, J. D.; LIGI, D.; MANISCALCO, R.; KHALIL, R. A.; MANNELLO, F. Why Venous Leg Ulcers Have Difficulty Healing: overview on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. **Journal of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 29, 24 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm10010029>.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilms resistance. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, 2012.

RAZIYEVA, K.; KIM, Y.; ZHARKINBEKOV, Z.; KASSYMBEK, K.; JIMI, S.; SAPAROV, A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 700, 8 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom11050700>.

REINHART, A.; OGLESBY-SHERROUSE, A. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. **Genes**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 126, 14 dez. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes7120126>.

RIBEIRO, M.; SOUSA, C. A.; SIMÕES, M. Harnessing microbial iron chelators to develop innovative therapeutic agents. **Journal of Advanced Research**, [S.L.], v. 39, p. 89-101, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2021.10.010>.

RICHTER, K.; THOMAS, N.; CLAEYS, J.; MCGUANE, J.; PRESTIDGE, C. A.; COENYE, T.; WORMALD, P. J.; VREUGDE, S. A Topical Hydrogel with Deferiprone and Gallium-Protoporphyrin Targets Bacterial Iron Metabolism and Has Antibiofilm Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 61, n. 6, jun. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00481-17>.

ROBLES-TENORIO, A.; LEV-TOV, H.; OCAMPO-CANDIANI, J. Venous Leg Ulcer. **StatPearls Publishing**, jan. 2022.

ROQUINI, D. B.; COGO, R. M.; MENGARDA, A. C.; MAZLOUM, S. F.; MORAIS, C. S.; XAVIER, R. P.; SALVADORI, M. C.; TEIXEIRA, F. S.; FERREIRA, L. E.; PINTO, P. L.; MORAIS, T. R.; MORAES, J. Promethazine exhibits antiparasitic properties *in vitro* and reduces worm burden, egg production, hepato-, and splenomegaly in a schistosomiasis animal model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 12, 2019.

ROSSITER, S. E.; FLETCHER, M. H.; WUEST, W. M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. **Chemical reviews**, v. 117, n.19, 2017.

ROY, S.; ELGHARABLY, H.; SINHA, M.; GANESH, K.; CHANEY, S.; MANN, E.; MILLER, C.; KHANNA, S.; BERGDALL, V. K.; POWELL, H. M. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function. **The Journal of Pathology**, [S.L.], v. 233, n. 4, p. 331-343, 27 maio 2014. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/path.4360>.

SEN, C. K. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 2, p. 39-48, 2019.

SHAHZAD, M. N.; AHMED, N. Effectiveness of Aloe Vera gel compared with 1% silver sulphadiazine cream as burn wound dressing in second degree burns. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 63, n. 2, p. 225-230, fev. 2013. PMID: 23894900.

SHIRLAW, O.; BILLAH, Z.; ATTAR, B.; HUGHES, L.; QASAYMEH, R. M; SEIDEL, V; EFTHIMIOU, G. Antibiofilm Activity of Heather and Manuka Honeys and Antivirulence Potential of Some of Their Constituents on the DsbA1 Enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics** (Basel), v. 9, n. 12, p. 911. 2020.

SIBBALD, R. G.; ELLIOTT, J. A.; VERMA, L.; BRANDON, A.; PERSAUD, R.; AYELLO, E. A. Update: topical antimicrobial agents for chronic wounds. **Advances in Skin & Wound Care**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 438-450, out. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1097/01.asw.0000524471.28441.b9>.

SIDRIM, J. J. C.; AMANDO, B. R.; GOMES, F. I. F.; DO AMARAL, M, S. M. G.; DE SOUSA, P. C. P.; OCADAQUE, C. J.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Chlorpromazine-impregnated catheters as a potential strategy to control biofilm-associated urinary tract infections. **Future Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 1023–1034. 2019.

SIDRIM, J. J. C; VASCONCELOS, D. C; RIELLO, G. B; GUEDES, G. M. M; SERPA, R; BANDEIRA, T. J. P. G; MONTEIRO, A. J; CORDEIRO, R. A; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M; ROCHA, M. F. G; BRILHANTE, R. S. N. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, v. 33, n. 1, p. 88-97. 2017.

SIDRIM, J. J. C.; VASCONCELOS, D. C.; RIELLO, G. B.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 88-97, 12 dez. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2016.1262846>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. São Paulo: Editora Clannad, 2019.

SOUTHARD, B. T.; KHALILI, Y. A. Promethazine. **StatPearls**, 2022.

STAR, A. Differentiating Lower Extremity Wounds: arterial, venous, neurotrophic. **Seminars in Interventional Radiology**, [S.L.], v. 35, n. 05, p. 399-405, dez. 2018. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1676362>.

STAVROPOULOU, E.; VOIDAROU, C.; ROZOS, G.; VAOU, N.; BARDANIS, M.; KONSTANTINIDIS, T.; VRIONI, G.; TSAKRIS, A. Antimicrobial Evaluation of Various Honey Types against Carbapenemase-Producing Gram-Negative Clinical Isolates. **Antibiotics**, [S.L.], v. 11, n. 3, 21 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics11030422>.

TOTTOLI, E. M.; DORATI, R.; GENTA, I.; CHIESA, E.; PISANI, S.; CONTI, B. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 735, 5 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>.

TROSTRUP, H.; LAULUND, A. S. B.; MOSER, C. Insights into Host–Pathogen Interactions in Biofilm-Infected Wounds Reveal Possibilities for New Treatment Strategies. **Antibiotics**, v. 9, n. 7, 2020.

UBBINK, D.T.; LINDEBOOM, R.; ESKES, A.M.; BRULL, H.; LEGEMATE, D. A.; VERMEULEN, H. Predicting complex acute wound healing in patients from a wound expertise centre registry: a prognostic study. **International Wound Journal**, v. 12, n. 5, p. 531-536. 2015. doi:10.1111/iwj.12149.

VERMEULEN, H.; WESTERBOS, S. J.; UBBINK, D. T. Benefit and harm of iodine in wound care: a systematic review. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, p. 191-199. 2010.

VISCA, P.; BONCHI, C.; MINANDRI, F.; FRANGIPANI, E.; IMPERI, F. The Dual Personality of Iron Chelators: growth inhibitors or promoters? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 57, n. 5, p. 2432-2433, maio 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02529-12>.

WALLACE, H. A.; BASEHORE, B. M.; ZITO, P. M. Wound Healing Phases. **StatPearls Publishing**, nov. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>.

WEI, D.; ZHU, X. M.; CHEN, Y. Y.; LI, X. Y.; CHEN, Y. P.; LIU, H. Y.; ZHANG, M. Chronic wound biofilms. **Chinese Medical Journal**, [S.L.], v. 132, n. 22, p. 2737-2744, 20 nov. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cm9.0000000000000523>.

WHITE, R. Manuka honey in wound management: greater than the sum of its parts? **Journal of Wound Care**, v. 25, n. 9, 2016.

WICKRAMASINGHE, N. N.; HLAING, M. M.; RAVENSDALE, J. T.; COOREY, R.; CHANDRY, P. S.; DYKES, G. A. Characterization of the biofilm matrix composition of

psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1545-1567, 5 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-73612-0>.

WILLIAMS, M. Wound infections: an overview. **British Journal of Community Nursing**, v. 26, n. 6. 2021.

WU, Y. K.; CHENG, N. C.; CHENG, C. M. Biofilms in Chronic Wounds: pathogenesis and diagnosis. **Trends in Biotechnology**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 505-517, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.011>.

YAGHOUBI, R.; KAZEROUNI, A.; KAZEROUNI, O. Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-bacterial, Anti-inflammatory Anti-oxidant and Anti-viral Agent: A Review. **Jundishapur journal of natural pharmaceutical products**, v. 8, n.3, 2013.

YANG, Q.; PHILLIPS, P. L.; SAMPSON, EDITH M.; PROGULSKE-FOX, A.; JIN, S.; ANTONELLI, P.; SCHULTZ, G. S. Development of a novel ex vivo porcine skin explant model for the assessment of mature bacterial biofilms. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 5, p. 704–714. 2013.

YU, S.; WEI, Q.; ZHAO, T.; GUO, Y.; MA, L. Z. A Survival Strategy for *Pseudomonas aeruginosa* That Uses Exopolysaccharides to Sequester and Store Iron to Stimulate Psl-Dependent Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 21, p. 6403-6413, nov. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01307-16>.

ZABAGLO. M.; SHARMAN, T. Postoperative Wound Infection. **StatPearls**, 2021.

ZHANG, F.; CHEN, Z.; SU, F.; ZHANG, T. Comparison of topical honey and povidone iodine-based dressings for wound healing: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Wound Care**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 28-36, 1 abr. 2021. Mark Allen Group. <http://dx.doi.org/10.12968/jowc.2021.30.sup4.s28>.

ZHAO, G.; USUI, M. L.; LIPPMAN, S. I.; JAMES, G. A.; STEWART, P. S.; FLECKMAN, P.; OLERUD, J. E. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 389-399, set. 2013.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 181-191, 2018.

ZORIAH, A.; HASSAN, B. A. R. The effects of honey compared to silver sulfadiazine for the treatment of burns: a systematic review of randomized controlled trials. **Burns**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 50-57, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2016.07.004>.