



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

RODRIGO MACHADO PINHEIRO

**MODELO *EX VIVO* DE FERIDA EM PELE PORCINA PARA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME BACTERIANO**

FORTALEZA

2021

RODRIGO MACHADO PINHEIRO

MODELO *EX VIVO* DE FERIDA EM PELE PORCINA PARA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME BACTERIANO

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.

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

Coorientador: Prof. Dr. Gláucia Morgana de Melo Guedes.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- P722m Pinheiro, Rodrigo Machado.
Modelo ex vivo de ferida em pele porcina para avaliação de compostos com atividade antibiofilme bacteriano / Rodrigo Machado Pinheiro. – 2021.
54 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profª. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
Coorientação: Profª. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes.
1. Biofilmes . 2. Ex vivo. 3. Modelo de Ferida. 4. Sensibilidade. I. Título.

CDD 616.9

RODRIGO MACHADO PINHEIRO

MODELO *EX VIVO* DE FERIDA EM PELE PORCINA PARA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME BACTERIANO

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: 10/12/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Debora Castelo Branco De Souza Collares Maia (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Glucia Morgana De Melo Guedes (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Viviane Mamede Vasconcelos Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Thereza Maria Magalhães Moreira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A minha mãe, avós, familiares e amigos

Aos que resistem em busca de um sonho

Aos que não resistiram buscando um sonho

Aos que buscam o conhecimento para o bem

do outro

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, lugar onde cresci imensamente como pessoa e profissional;

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

À Professora Débora Castelo Branco e Professora Gláucia Guedes, por serem referência e inspiração. A paciência, sabedoria e vontade de ensinar que inspira e motiva seus alunos. Serei eternamente grato pelas oportunidades e aprendizados.

À banca de qualificação, Professora Giovanna Riello e Dra Silviane Praciano pelas contribuições para a defesa;

À banca de defesa, Professora Viviane Mamede e Professora Thereza Moreira pelas valorosas sugestões;

Agradeço a minha mãe, Aglaê, pelo amor incondicional e pelo esforço desde a criação até o presente dia;

Aos meus avós, pelo suporte e acolhida, onde eu sempre encontrarei um lar e braços abertos para voltar se precisar;

Aos familiares e amigos, pelo apoio e suporte por toda a minha trajetória;

Ao meu amigo Ramon (*In memoriam*) pelo papel essencial na minha formação humana;

À minha companheira de laboratório e da vida, Alyne, pelo convívio e aprendizado;

Aos amigos de faculdade, em especial: Izabel, Gabriel Angelo, Gabriel Albrecht, Michaeli e Nathália, por serem para mim inspiração e suporte;

Aos companheiros Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GraMM), pela disponibilidade e vontade de ajudar.

“Acho que os sentimentos se perdem nas palavras. Todos deveriam ser transformados em ações, em ações que tragam resultados.”

— Florence Nightingale

RESUMO

Feridas são resultado da quebra da integridade da pele através de processos patológicos ou danos exógenos. Um dos principais fatores para a cronificação de feridas é a infecção, principalmente quando esta está associada a presença de biofilmes. Para avaliar novas terapias que sejam efetivas contra o biofilme bacteriano, torna-se necessário dispor de um modelo de estudo de compostos antibiofilme que mimetize o tratamento de feridas *in vivo*, e uma opção para isto é o modelo *ex vivo*. Assim, este estudo teve como objetivo propor uma nova metodologia de sensibilidade em modelo *ex vivo* de feridas para avaliação de compostos com efeito antibiofilme. Para isso, uma cepa de *S. aureus* (ATCC 29213) e uma cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) tiveram seu perfil de sensibilidade testado *in vitro* em forma planctônica e de biofilme para ciprofloxacina e polyhexanida biguanida (PHMB), compostos utilizados no tratamento de feridas. Posteriormente, foi realizado o corte da pele porcina e feita a desinfecção com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 0,615% e a confecção da ferida utilizando um punch nº 8 e um bisturi. Os biofilmes foram formados no modelo *ex vivo* utilizando um inóculo de $1,8 \times 10^9$ em meio BHI + 1% de glicose e crescidos por 72 horas a 37 °C em estufa bacteriológica. Após, foi realizado o tratamento com gaze impregnada com a ciprofloxacina nas concentrações de CEMB e 2x CEMB, sendo 2 µg/mL e 4 µg/mL e 8 µg/mL e 16 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. O PHMB foi utilizado puro (100 µg/mL). As peles foram novamente colocadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. Foi realizado o desbridamento da lesão e um *swab* foi introduzido na ferida. O efeito dos compostos foi avaliado através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e, posteriormente, tiveram a arquitetura e viabilidade dos biofilmes observadas através de microscopia confocal. A redução na contagem de UFC foi 96% e 100% para ciprofloxacina, para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. PHMB apresentou redução de UFC superior a 70% para ambos os microorganismos. A estrutura do biofilme de *Staphylococcus aureus* apresentou maior dispersão (P=0.0355) em relação ao controle e menor biomassa para ciprofloxacina; o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* teve biomassa reduzida para ambos os compostos, ciprofloxacina (P=0,0336) e PHMB (P=0,0057). O uso deste modelo traz a possibilidade de testes para novas alternativas de tratamento de biofilmes em feridas, uma vez que mimetiza o crescimento de biofilmes *in vivo* e o tratamento na prática clínica.

Palavras-chave: Biofilmes. *Ex vivo*. Modelo de ferida. Sensibilidade

ABSTRACT

Wounds result from the breakdown of skin integrity through pathological processes or exogenous damage. One of the main factors for the chronicity of wounds is infection, especially when this is associated with the presence of biofilms. To evaluate new therapies that are effective against bacterial biofilm, it is necessary to have a study model of antibiofilm compounds that mimic the treatment of wounds *in vivo*, and an option for this is the *ex vivo* model. Thus, this study aimed to propose a new sensitivity methodology in an *ex vivo* wound model for the evaluation of compounds with an antibiofilm effect. For this, a strain of *S. aureus* (ATCC 29213) and a strain of *P. aeruginosa* (ATCC 27853) had their sensitivity profile tested *in vitro* in planktonic and biofilm form for ciprofloxacin and polyhexanide biguanide (PHMB), compounds used in the wound care. Subsequently, the porcine skin was cut and disinfected with 70% alcohol and 0.615% sodium hypochlorite, and the wound was made using a number 8 punch and a scalpel. Biofilms were formed in the *ex vivo* model using a 1.8×10^9 inoculum in BHI medium + 1% glucose and grown for 72 hours at 37 °C in a bacteriological incubator. Afterwards, treatment was performed with gauze impregnated with ciprofloxacin at CEMB and 2x CEMB concentrations, 2 µg/mL and 4 µg/mL and 8 µg/mL and 16 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. PHMB was used neat (100 µg/ml). The skins crafts were again placed in a bacteriological incubator for 24 hours at 37 °C. Debridement of the wound was performed and a swab was introduced into the wound. The effect of the compounds was evaluated by counting Colony Forming Units (CFU) and, later, the architecture and viability of the biofilms were observed through confocal microscopy. The reduction in CFU count was 96% and 100% for ciprofloxacin, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. PHMB showed a CFU reduction greater than 70% for both microorganisms. The structure of the *Staphylococcus aureus* biofilm showed greater dispersion (P=0.0355) compared to the control and lower biomass; the biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* had reduced biomass for both compounds, ciprofloxacin (P=0.0336) and PHMB (P=0.0057). The use of this model brings the possibility of testing new alternatives for the treatment of biofilms in wounds, as it mimics the growth of biofilms *in vivo* and the treatment in clinical practice.

Keywords: Biofilms. *Ex vivo*. Wound model. Susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases da cicatrização.....	17
Figura 2 – Mecanismo fisiopatológico da Lesão por Pressão.....	20
Figura 3 – Mecanismo fisiopatológico das úlceras venosas.....	21
Figura 4 – Mecanismo fisiopatológico da Ulcera do Pé Diabético.....	22
Figura 5 – Fases de crescimento do biofilme.....	23
Figura 6 – Diluição seriada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
Figura 7 – Processo de montagem do modelo <i>ex vivo</i> de feridas	31
Figura 8 – Fragmento de pele porcina antes e após tratamento.....	32
Figura 9 – Microscopia confocal dos biofilmes bacterianos em modelo <i>ex vivo</i> após o tratamento com Ciprofloxacina, PHMB e o controle com soro fisiológico 0,9%.....	37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa* crescidos em modelo *ex vivo* em pele..... 31
- Gráfico 2 – Análises microscópicas confocal de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* crescidos *ex vivo* em fragmentos de pele porcina..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração eliminatória mínima sobre o biofilme (CEMB) da ciprofloxacina e do PHMB contra biofilmes de <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) e uma cepa de <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	29
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LPP	Lesões Por Pressão
PHMB	Poliexanida Biguanida
SUS	Sistema Único de Saúde
ADP	Adenosina Disfosfato
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
IL	Interleucina
SMA	Actina de Músculo Liso
UDP	Úlceras do Pé Diabético
CIM	Concentrações Inibitórias Mínimas
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CEMB	Concentração Eliminatória Mínima sobre o Biofilme
SF	Soro Fisiológico
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Feridas	16
2.1.1	Fases da cicatrização	17
2.1.1.1	<i>Hemostasia</i>	18
2.1.1.2	<i>Fase inflamatória</i>	18
2.1.1.3	<i>Fase proliferativa</i>	19
2.1.1.4	<i>Fase de remodelação</i>	19
2.1.2	Feridas crônicas	19
2.1.3	Feridas infectadas	22
2.2	Biofilmes	23
2.2.1	Biofilmes em feridas	23
2.3	Modelos de ferida para avaliação de biofilmes	24
3	HIPÓTESES	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	Objetivo geral	27
4.2	Objetivos específicos	27
5	METODOLOGIA	28
5.1	Micro-organismos do estudo	28
5.2	Determinação <i>in vitro</i> das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos	28
5.3	Análise <i>in vitro</i> do efeito da ciprofloxacina e do PHMB sobre biofilmes maduros e <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	29
5.4	Obtenção, processamento e desinfecção da pele porcina e formação da ferida	30
5.5	Formação do biofilme na ferida e avaliação da ação da Ciprofloxacina e PHMB sobre os biofilmes maduros formados em modelo <i>ex vivo</i>	30
5.5.1	Quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)	32
5.5.2	Confocal laser scanning microscopy (CLSM) dos biofilmes <i>ex vivo</i>	32
5.5.3	Análise Estatística	33
6	RESULTADOS	34

6.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Eliminatória Mínima em Biofilme (CEMB) de ciprofloxacina e PHMB	34
6.2	Efeito da ciprofloxacina e do PHMB sobre biofilmes em modelo ex vivo	34
7	DISCUSSÃO	38
8	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Feridas são resultado da quebra da integridade da pele através de processos patológicos ou danos exógenos. Todas as feridas tem o potencial de se tornarem crônicas caso esteja associada a uma patologia de base ou o tratamento seja inadequado. Feridas crônicas são aquelas que falharam no processo fisiológico de reparação dos tecidos, apresentando um processo de cicatrização superior a um mês (DHALL *et al.*, 2014; CLINTON *et al.*, 2015). Todas as feridas têm o potencial para se tornarem crônicas, principalmente na presença de insuficiência vascular e infecção, o que gera uma resposta inflamatória prolongada e consequentemente a falha na epitelização (CLINTON *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2018).

As principais etiologias associadas à cronificação de feridas são as Lesões Por Pressão (LPP), úlceras de pernas associadas ao sistema vascular e pé diabético. São consideradas um problema de saúde pública, com diversos impactos, tanto na vida das pessoas que vivem com a ferida e seus familiares, quanto economicamente para o sistema de saúde (SCHULTZ *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018).

Quando ocorre a abertura da pele, instantaneamente ocorre a migração de micro-organismos para o leito da ferida. Durante a fase aguda, os micro-organismos encontrados serão principalmente os que fazem parte da microbiota da pele. Com a demora da cicatrização, pode ocorrer a contaminação da ferida por micro-organismos exógenos, que podem passar de colonizadores para agentes causadores de infecção. A literatura traz que 10^5 UFC/g de tecido oriundo da ferida é o ponto de corte para considerar uma ferida como infectada (ZHAO *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2016; NEGUT *et al.*, 2018). Os micro-organismos mais associados a infecção de feridas crônicas são *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias capazes de adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos (RHOADS *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2017).

Após se aderirem ao leito da lesão, os micro-organismos podem assumir um estado sésil e produzir uma matriz extracelular formada de polissacarídeo, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, chamado de biofilme. Essa estrutura proporciona resistência às defesas do hospedeiro, facilita a troca de genes de virulência e gera suporte estrutural e bioquímico aos micro-organismos, além de impedir a contração e epitelização da ferida (REGULSKI *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018). Malone *et al.* (2017a), em uma revisão sistemática, relataram uma prevalência de biofilmes em feridas crônicas de 78,2%, podendo chegar a 100%, o que dificulta o manejo clínico dessas feridas.

A resistência bacteriana associada à presença constante de biofilme no leito da ferida gera uma resposta inflamatória exacerbada e, conseqüentemente, um retardo na cicatrização, dificultando a terapia (OMAR *et al.*, 2017). Nesse contexto, considerando a elevada prevalência de biofilmes bacterianos em feridas crônicas, compostos com atividade antibiofilme, como a *poliexanida biguanida* (PHMB), tem sido utilizados como adjuvantes terapêuticos (ALVES *et al.*, 2021). Levando em consideração que grande parte dos estudos focam em antibioticoterapia usando bactérias em estado planctônico, esta pode não ser eficaz quando utilizada em tratamentos de rotina, devido à presença do biofilme (GUEDES *et al.*, 2021). Ademais, biofilmes formados *in vitro* para avaliar a atividade antibiofilme de diferentes compostos também podem gerar dados pouco confiáveis *in vivo*, como mostrado em uma revisão de Castelo-Branco *et al.*, 2020. Assim, torna-se necessário utilizar metodologias que mimetizem a geometria do leito da lesão e proporcionem um microambiente semelhante ao real para avaliar o desenvolvimento dos biofilmes e como respondem aos tratamentos.

Dessa forma, este trabalho tem o objetivo de padronizar um ensaio de sensibilidade de biofilmes microbianos crescidos em um modelo *ex vivo* de feridas para avaliar compostos com atividade antibiofilme.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Feridas

A pele é o maior órgão do corpo humano e apresenta diversas funções para a homeostase do organismo, além de fornecer uma barreira imunológica contra agentes potencialmente lesivos (WILKINSON *et al.*, 2020). Feridas são definidas como qualquer dano causado a integridade dos tecidos biológicos através de um processo patológico ou dano exógeno com possível perda estrutural e de função local (HERMAN *et al.*, 2021; KANGAL *et al.*, 2021).

Os dados epidemiológicos acerca de incidência e prevalência de pessoas com feridas permanecem escassos e não estabelecidos, porém, estima-se que até 2% da população irá apresentar uma ferida crônica durante a vida em países desenvolvidos (GRAVES & ZHENG, 2014; JARBRINK *et al.*, 2016). Uma revisão de Martinengo e colaboradores (2018) apontou uma prevalência mundial de 2.21 a cada 1,000 habitantes, destacando o grande percentual de estudos (82%) também de países desenvolvidos, além de ignorar feridas tratadas fora do sistema de saúde. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, as estimativas são pontuais e regionalizadas, o que gera uma escassez para estender essa prevalência para uma escala nacional.

Ademais, em diversos cenários, as feridas são consideradas uma comorbidade secundária a outra doença, minimizando as consequências destas e levando a uma subnotificação no sistema de saúde (GRAVES & ZHENG, 2014; JARBRINK *et al.*, 2017). Alto impacto econômico e diminuição da qualidade de vida das pessoas são fatores comumente associados a esse contexto, onde ambos poderiam ser atenuados com um manejo adequado dessas feridas (NUNAN *et al.*, 2014; GUEST *et al.*, 2015; OLSSON *et al.*, 2018).

O gasto anual com o tratamento de feridas chegou a 5,5% do orçamento do sistema de saúde do País de Gales (PHILLIPS *et al.*, 2016); £5,6 bilhões no Reino Unido (GUEST *et al.*, 2020); e quase \$100 bilhões nos Estados Unidos (NUSSBAUM *et al.*, 2017; SEM, 2019). Não foram encontrados dados sobre o gasto do Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil com feridas.

Quanto aos impactos ao paciente, destaca-se principalmente dor, diminuição da mobilidade e produtividade profissional (OLSSON *et al.*, 2018).

2.1.1 Fases da cicatrização

Cicatrização é o processo fisiológico complexo de restauração dos tecidos através de processos biológicos de contenção de dano, limpeza e proliferação celular com ação de diversos mediadores, entre eles células estruturais, células imunológicas, fatores de crescimento e citocinas (WALLACE *et al.*, 2021). Esses processos são divididos em 4 fases: hemostasia, inflamatória, proliferativa e remodelamento (WILKINSON *et al.*, 2020). (FIGURA 1).

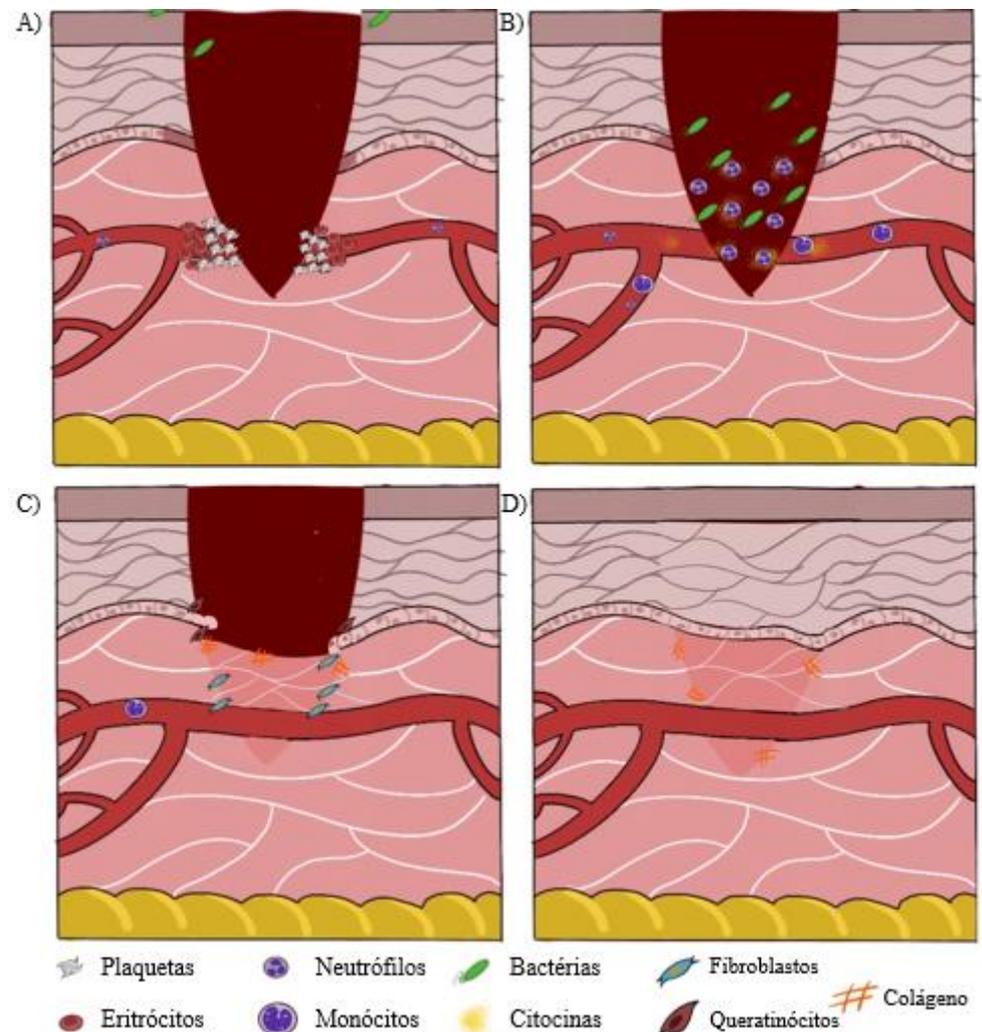


Figura 1: Fases da cicatrização. A) Hemostasia; B) Fase inflamatória; C) Fase proliferativa; D) Fase de remodelamento.

Fonte: Figura do autor

2.1.1.1 Hemostasia

Inicialmente, existe uma contração vascular dos vasos da área lesada e ativação das cascatas intrínseca e extrínseca da coagulação com o objetivo de minimizar a perda sanguínea (GONZALEZ *et al.*, 2016; WALLACE *et al.*, 2021). A liberação de Adenosina Disfosfato (ADP) gera o início do processo de trombose e agregação plaquetária local após a exposição da matriz subendotelial e, posteriormente, as plaquetas se aderem aos vasos com a interação de proteínas como Fator de von Willebrand, colágeno e fibronectina (WILKINSON *et al.*, 2020). A deposição de fibrina serve de adesão para os fatores de coagulação e as plaquetas geram um *feedback* positivo a partir de grânulos densos para a ativação de uma grande quantidade de plaquetas, formando um trombo (GOLEBIEWSKA *et al.*, 2015) (FIGURA 1A).

2.1.1.2 Fase inflamatória

A ativação plaquetária e do sistema complemento, além da presença de Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) no leito da ferida, estimulam a migração leucocitária com grande quantidade de neutrófilos nas primeiras horas após a abertura da ferida até 4 dias após (FRYKBERG *et al.*, 2015; GONZALEZ *et al.*, 2016; WILKINSON *et al.*, 2020).

Os neutrófilos se ligam às selectinas e integrinas no endotélio, liberam citocinas e quimiocinas e iniciam o recrutamento e ativação de mais células inflamatórias para o leito da ferida. Além disso, se ligam aos receptores de patógenos opsonizados promovendo a fagocitose dos micro-organismos. Ademais, liberam espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteases para “limpar” a ferida. A degranulação dos neutrófilos também promove a migração de monócitos presentes nos vasos que, posteriormente, são diferenciados em macrófagos (CAÑEDO-DORANTES *et al.*, 2019). (FIGURA 1B).

Inicialmente, os macrófagos realizam fagocitose de micro-organismos e resíduos celulares, além de liberar fatores pró-inflamatórios. Durante a transição para a fase de proliferação, a liberação de interleucinas (IL-4 e IL-10) e prostaglandinas fazem uma transição desses macrófagos para o fenótipo M2, para secreção de fatores de crescimento e mediadores anti-inflamatórios, além de fagocitose de neutrófilos (LANDÉN *et al.*, 2016; CAÑEDO-DORANTES *et al.*, 2019).

2.1.1.3 Fase proliferativa

A fase proliferativa tem início com a migração de queratinócitos da região adjacente da ferida que são ativados pela alteração mecânica e perda da tensão física das células e liberados por colagenases e elastases. Essas células liberam proteínas para a reconstrução da membrana basal na ferida (LANDÉN *et al.*, 2016). Os fibroblastos respondem a citocinas e fatores de crescimento liberados pelos macrófagos e liberam colágeno que irá substituir a matriz provisória de fibrina (CAÑEDO-DORANTES *et al.*, 2019). A matriz extracelular é então depositada para a formação de tecido de granulação, composto também de ácido hialurônico, colágeno, elastina e proteoglicanos, preenchendo a cavidade da lesão e estimulando a angiogênese a partir de fatores pró-angiogênese, que por sua vez são liberados pelos macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. (ELLIS *et al.*, 2018; CAÑEDO-DORANTES *et al.*, 2019; ALHAJJ *et al.*, 2020). (FIGURA 1C).

2.1.1.4 Fase de remodelação

O colágeno do tipo III, rapidamente formado e fraco, é gradualmente substituído por colágeno do tipo I, que é mais estável e está abundantemente presente no tecido cicatricial e restaura a força de tensão na ferida (ALHAJJ *et al.*, 2020; WILKINSON *et al.*, 2020). A tensão mecânica e citocinas estimulam a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos que expressam α -actina de músculo liso (SMA) para a contração da ferida. Esse novo tecido apresenta cerca de 80% da resistência da pele não lesada (LANDÉN *et al.*, 2016; WILKINSON *et al.*, 2020). (FIGURA 1D).

2.1.2 Feridas crônicas

Feridas crônicas são aquelas que falharam no processo de cicatrização (ZHAO *et al.*, 2016). Não existe consenso no tempo de permanência da ferida para esta ser considerada crônica, porém, o mais aceito é um tempo de 1-3 meses (DHALL *et al.*, 2014; CLINTON *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2016). Esse processo está associado a uma estagnação da ferida na fase inflamatória (FRYKBERG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2016) com a constante presença de

infiltrado inflamatório, hiperatividade de queratinócitos e ausência de atividade dos fibroblastos e, conseqüentemente, atraso na epitelização (NUNAN *et al.*, 2014; DARWIN *et al.*, 2018). Para viabilizar a cicatrização da ferida crônica, o agente nocivo, como a grande quantidade de micro-organismos ou determinadas células do sistema imune inato, deve ser cessado (NUNAN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2016).

Todas as feridas têm o potencial de se tornarem crônicas caso esteja associada a uma patologia de base ou o tratamento seja inadequado, o que gera sofrimento ao paciente, prolongamento de internações e um grande impacto econômico no sistema de saúde (EAGLE, 2009). As feridas crônicas mais prevalentes são as Lesões por Pressão (LP), úlceras associadas ao sistema vascular e Úlceras do Pé Diabético (UPD) (FRYKBERG *et al.*, 2015; SCHULTZ *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018).

Lesão por Pressão ocorre com a pressão não aliviada do corpo, principalmente sobre uma proeminência óssea, o que leva a uma isquemia local e eventualmente necrose tecidual. Ocorrem geralmente nas regiões sacra, calcâneos, escápulas, occipital e trocanteres, e podem apresentar-se desde hiperemias não branqueáveis da epiderme até comprometimento total dos tecidos com exposição de ligamentos e ossos (MONDRAGON; ZITO, 2021). A prevalência dessas lesões varia de acordo com o quadro clínico do paciente e perfil de internamento da unidade, mas estima-se cerca de 5-15%, com maior número de pessoas em unidades de internação críticas e de longa permanência (MERVIS; PHILLIPS, 2019). Essas feridas causam danos que vão de dor até prolongamento da hospitalização e morte, gerando também um alto custo de tratamento e, conseqüentemente, um impacto econômico pro sistema de saúde. (RONDINELLI *et al.*, 2018; MILLER *et al.*, 2019). Ademais, pacientes com ulceras de difícil cicatrização estão expostos a infecção, podendo agravar para casos de sepse (BOROJENY *et al.*, 2020).

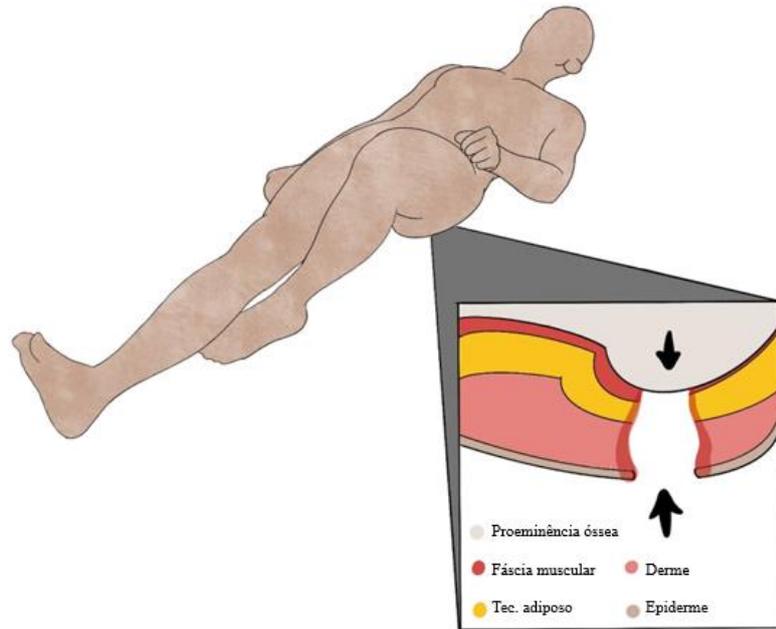


Figura 2: Mecanismo fisiopatológico da Lesão por Pressão.

Fonte: Imagem do autor

As úlceras de perna associadas ao sistema vascular estão intimamente relacionadas com insuficiência venosa ou hipertensão vascular causadas pelo refluxo sanguíneo ou obstrução dos vasos e, conseqüentemente, dano tecidual e formação da ulcera (ROBLES-TENORIO *et al.*, 2021). A estimativa internacional de casos vai de 0,05% a 2,5%, com maior prevalência em unidades de internação para pessoas idosas (GRAVES; ZHENG, 2014). Se não tratadas corretamente, essas úlceras podem gerar imobilidade, celulite, diminuição da qualidade de vida, osteomielite e infecções severas (RAFFETTO *et al.*, 2020).

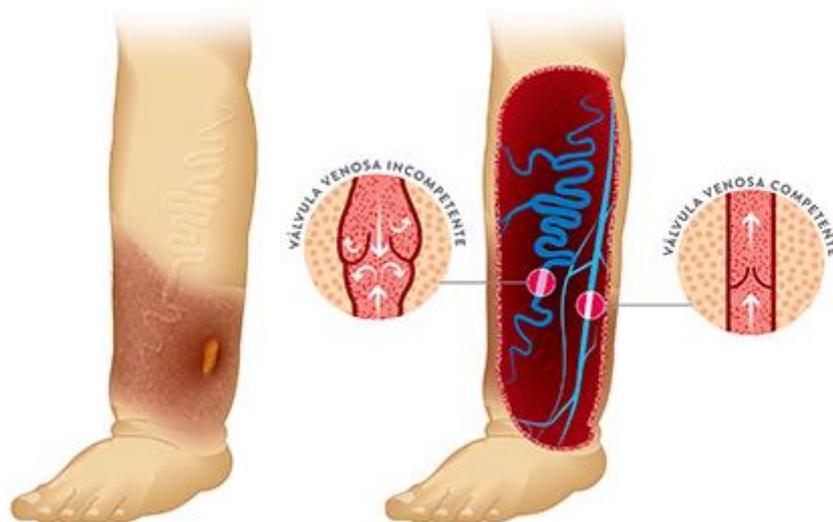


Figura 3: Mecanismo fisiopatológico das úlceras venosas.

Fonte: PAZ-DIAS, 2021.

As úlceras do pé diabético (UPDs) costumam coexistir com polineuropatia diabética (PND) ou doença arterial periférica (DAP), representando um aumento no número de internações prolongadas e complicações, como amputações e infecções. As infecções do pé diabético (IPD) está associada à necessidade de uso de antimicrobianos, por vezes de forma inadequada, morbidades substanciais e custos elevados para a saúde (IWGDF, 2019).

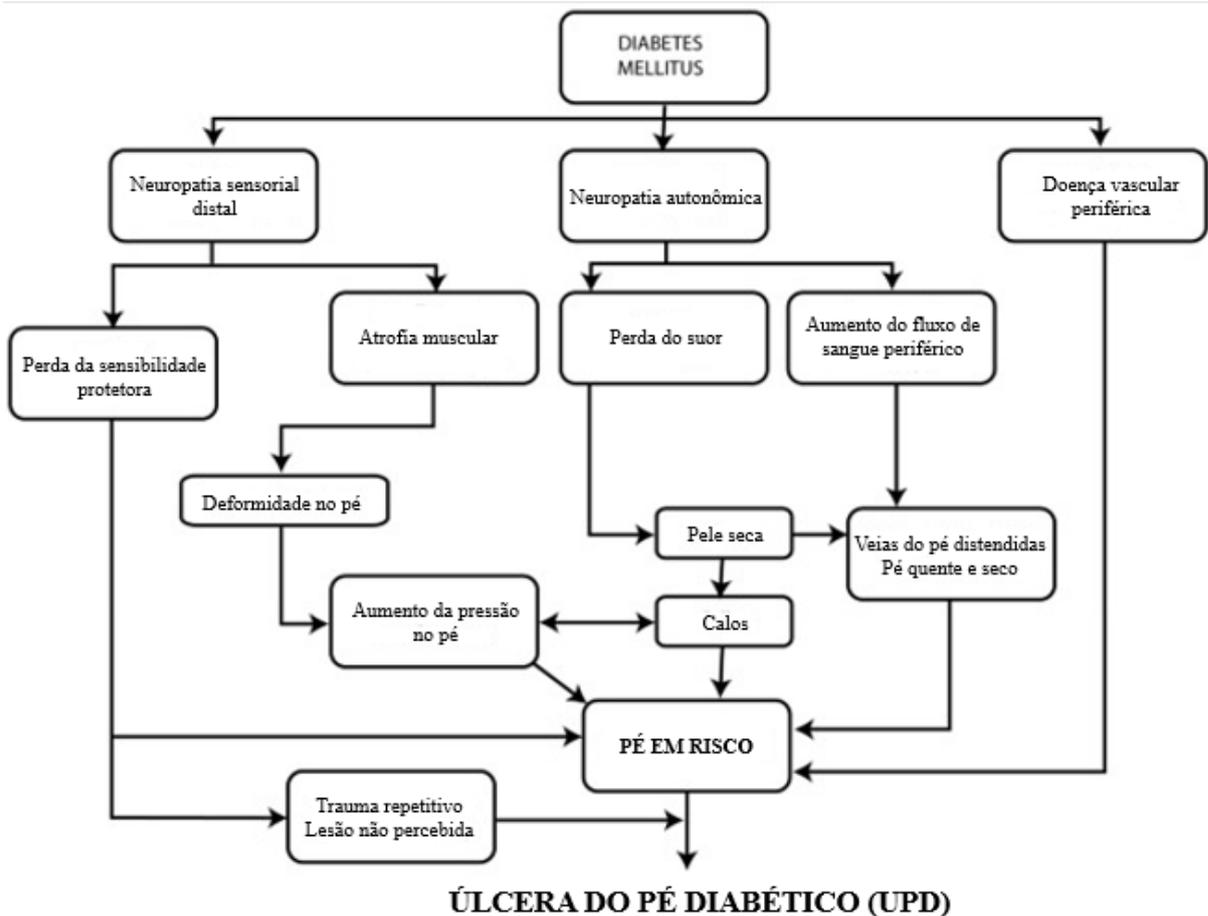


Figura 4: Mecanismo fisiopatológico da Úlcera do Pé Diabético.

Fonte: Adaptado de BOULTON, 2020.

2.1.3 Feridas infectadas

Com a abertura da pele, os micro-organismos da microbiota ganham acesso ao leito da ferida e encontram um meio favorável para seu crescimento, com ampla oferta de nutrientes e umidade (NEGUT *et al.*, 2018). Toda ferida crônica tem leito colonizado por micro-organismos (KAISER *et al.*, 2021), porém, a proliferação exacerbada destes pode levar

a um estado de infecção com risco de migração para tecidos mais profundos, podendo ocasionar uma infecção sistêmica (POWERS *et al.*, 2016). Com a invasão de tecidos saudáveis e estabelecimento da infecção, sinais como eritema disseminado, edema, exsudato purulento, celulite e sintomas como dor podem ser observados (NEGUT *et al.*, 2018)

Nas fases iniciais da ferida, é comum encontrar a presença de micro-organismos da microbiota da pele, principalmente *Staphylococcus aureus*. Com a cronificação da ferida, micro-organismos exógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* ganham o leito da ferida e tornam-se potenciais agentes de infecção (NEGUT *et al.*, 2018; KAISER *et al.*, 2021).

2.2 Biofilmes

Além da resistência associada a bactérias na forma planctônica, estes micro-organismos são capazes de formar biofilme. Trata-se de uma comunidade organizada de micro-organismos aderidos a uma superfície e entre si, envoltos de uma matriz extracelular polimérica que confere resistência mecânica aos estresses ambientais, além de possibilitar a interação e até troca de genes de virulência (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2016; KAISER *et al.*, 2021). Biofilmes estão associados a 60% das infecções humanas e são capazes de aumentar a resistência dos micro-organismos de 100 a 1000 vezes, comparado a forma planctônica (LI *et al.*, 2021).

As bactérias, quando em forma de biofilme, apresentam metabolismo lento e crescimento retardado, diferente da forma planctônica em que apresenta rápida proliferação e metabolismo e, por isso, sendo sensível a compostos que afetam suas atividades metabólicas (MALONE *et al.*, 2017b).

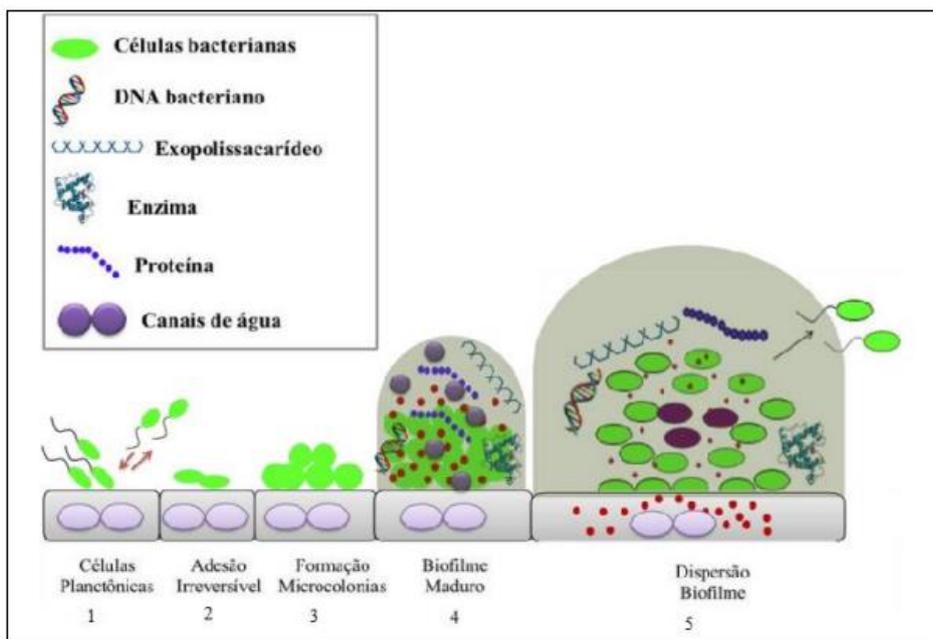


Figura 5: Fases de crescimento do biofilme.

Fonte: OCADAQUE, 2020.

2.2.1 Biofilmes em feridas e métodos de controle

A presença de biofilmes torna as bactérias menos suscetíveis ao sistema imunológico devido a barreira mecânica da matriz extra-celular e da impossibilidade de fagocitose das micro-colônias pelas células fagocíticas. Como consequência, o biofilme pode prolongar o tempo de cicatrização, intensificar a inflamação e gerar dispersão de fragmentos da colônia para tecidos adjacentes (KAISER *et al.*, 2021). As células bacterianas do biofilme possivelmente produzem enzimas proteolíticas que inibem e/ou destroem a matriz extra-celular dos tecidos viáveis (WOLCOTT *et al.*, 2008).

Estima-se que mais de 78% das feridas crônicas estejam associadas a biofilmes, com estudos apontando prevalência de 100% (MALONE *et al.*, 2017a). Assim, uma estratégia que vem sendo desenvolvida para o tratamento dessas feridas é o *Biofilm Based Wound Care* (BBWC). Trata-se de um modelo de procedimentos que deve ser realizado na prática clínica em tratamento de feridas para evitar que a presença de biofilmes prejudique a cicatrização, assim, propõe limpeza, desbridamento e curativo apropriado para diminuir a carga microbiana (EDWARDS-JONES, 2018).

Em feridas agudas, a simples limpeza com soro fisiológico 0,9% mostra-se eficaz, porém, quando existem sinais clínicos da presença de grande carga microbiana, torna-se

necessário utilizar antissépticos, como a *Poliexanida biguamida* (PHMB) associado a limpeza com o soro.

O PHMB se liga às membranas celulares bacterianas e à matriz do biofilme, além de interferir nas funções catabólicas e de biossíntese das bactérias por meio de seu efeito catiônico e surfactante (BAIN *et al.*, 2019). Assim, ele interage fortemente com a matriz de alginato e o LPS de *P. aeruginosa*, que possuem fortes cargas negativas (JUNKA *et al.*, 2018). Por outro lado, a matriz do biofilme de *S. aureus* permanece pouco conhecida na literatura, mas possivelmente é formada principalmente por proteínas citoplasmáticas (LEI *et al.*, 2017).

O desbridamento, além de remover tecidos necróticos e desvitalizados, tem o objetivo de destruir mecanicamente a estrutura polimérica do biofilme e conseqüentemente, possibilitando a penetração dos compostos tópicos e potencializando o efeito do tratamento. Além disso, o desbridamento de manutenção impede a reestruturação do biofilme e, conseqüentemente, sua reincidência (MALONE *et al.*, 2017b; EDWARDS-JONES, 2018).

Além do tratamento tópico, feridas infectadas podem necessitar da instituição de antibiótico sistêmico. Dentre as opções de fármacos, um dos mais utilizados é a ciprofloxacina, que é um antimicrobiano de amplo espectro cujo efeito bactericida é decorrente da inibição da enzima DNA-girase. Esse antimicrobiano vem sendo testado também em apresentação tópica em associação com curativos (LI *et al.*, 2017; MUHAMMAD *et al.*, 2018).

2.3 Modelos de Ferida para estudos biofilmes

Além da dificuldade no tratamento, o estudo dos biofilmes em feridas se torna um desafio por apresentar diversas limitações em relação aos modelos utilizados. Brackman *et al.* (2016) conduziu uma revisão sobre os modelos utilizados e demonstrou limitações em suas aplicações. O modelo *in vitro*, apesar de largamente utilizado, não apresenta a variação de temperatura comum no tecido, pode não refletir a forma que os micro-organismos crescem e se desenvolvem numa superfície biótica, além de não mimetizar a ultraestrutura da ferida em que os nutrientes são fornecidos na base do biofilme e o oxigênio do topo (THAARUP *et al.*, 2021). Em contrapartida, diversos modelos *in vivo* utilizam dano térmico para a confecção da ferida, utilizam biofilmes pré-formados *in vitro* e/ou apresentam limitação no tempo que os

tratamentos podem ser acompanhados, além das questões éticas envolvidas. Nesse contexto, a utilização de um modelo *ex vivo* surge como uma alternativa histologicamente viável e menos questões éticas e uso de animais envolvidos.

A pele porcina apresenta morfologia e fisiologia análogas à pele humana, incluindo processo de cicatrização semelhante, o que a torna um bom instrumento em modelos para estudos sobre cicatrização de feridas. Por mimetizar tão bem à estrutura da pele humana, quando autoenxertos não estavam disponíveis, xenoenxertos já foram utilizados em sobreviventes de queimaduras. No entanto, há poucos estudos que utilizam esse modelo (BRACKMAN; COENYE, 2016; KLEIN et al., 2018; PARNELL; VOLK, 2019).

Quanto à forma de confeccionar a ferida, não existe um consenso do que seria mais adequado. Diversos estudos têm utilizado o punch ou bisturi (BRACKMAN et al., 2016), porém Andersson et al. (2021) argumentam que um desafio nessa técnica seria a padronização da profundidade e superfície da ferida. Em contrapartida, utilizando o método de corte no lugar da queimadura, os tecidos são preservados para reprodução de diversos tipos de ferida, não só as térmicas.

Guedes *et al.*, (2021) realizaram a padronização de um modelo *ex vivo* em pele porcina para determinar as condições ideais para o crescimento de biofilmes bacterianos. Foi observado que o modelo fornecia um microambiente mais favorável para o crescimento de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em comparação ao modelo *in vitro*, além de alcançarem a maturidade do biofilme em 72 horas de crescimento. Isso permitiu estudos mais aprofundados nesse modelo de crescimento.

3. HIPÓTESES

1. O modelo *ex vivo* proporciona um microambiente que mimetiza a ultraestrutura da ferida, proporcionando um ambiente favorável para testes de sensibilidade de biofilmes bacterianos.
2. O PHMB e a Ciprofloxacina são capazes de erradicar o biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no modelo *ex vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estabelecer uma metodologia de sensibilidade de biofilmes bacterianos em modelo *ex vivo* de ferida em pele porcina.

4.2 Objetivos Específicos

Padronizar o teste de sensibilidade em modelo *ex vivo* para biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;

Testar compostos usados da prática clínica no tratamento de feridas para estabelecer o modelo como opção para o estudo de compostos antibiofilme.

5. METODOLOGIA

5.1 Micro-organismos do estudo

Foi utilizada uma cepa de *S. aureus* (ATCC 29213) e uma cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) mantidas em meio mínimo na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM), da Universidade Federal do Ceará.

5.2 Determinação *in vitro* das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos compostos em crescimento planctônico

O perfil de sensibilidade em crescimento planctônico foi determinado por técnica de microdiluição em caldo Mueller Hinton (Difco, EUA), em placas de 96 poços, de acordo com o documento M100 - S27 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). Inicialmente, as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram crescidas em caldo BHI por 24 horas e, posteriormente, semeadas em ágar BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas. Após isso, os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina estéril, ajustando a turbidez a 0,5 na escala de McFarland e diluídos numa concentração de 1/10 e 1/15 em caldo Mueller Hinton. Em seguida, as placas foram preenchidas com 100 µL de caldo MH, e 100 µL de ciprofloxacina (64 µg/mL) ou de PHMB (100 µg/mL) foram adicionados apenas na primeira coluna. Em seguida, foi realizada a diluição seriada, com concentrações variando de 0,03125 a 16 µg/mL para ciprofloxacina e 0,04883 a 25 µg/mL para o PHMB. A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano. Foram adicionados poços livres de droga como controle de crescimento bacteriano e poços livres de bactéria, como controle de esterilidade. (FIGURA 2)

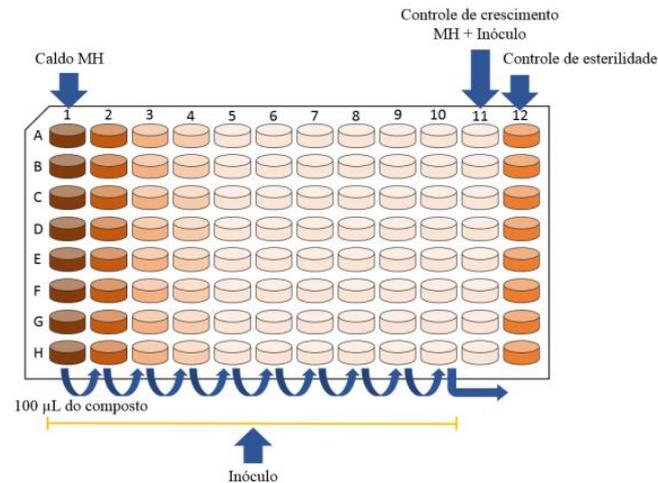


Figura 6: Esquema de teste de sensibilidade em placa de 96 poços com diluição seriada

Fonte: AMANDO, 2018.

5.3 Análise *in vitro* do efeito da ciprofloxacina e do PHMB sobre biofilmes maduros de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Para formação do biofilme maduro, foram inoculados 200 µL de uma suspensão preparada com 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose e 25 µL do inóculo bacteriano preparado na escala 6 Mcfarland em placas de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 48 horas para formação do biofilme. Após esse período, as placas foram lavadas cuidadosamente com PBS estéril, poço por poço, e foram adicionados 200 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose contendo concentrações crescentes de ciprofloxacina (0.03125-16 µg/mL) ou de PHMB (0,04883-25 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C, em estufa bacteriológica, por mais 24 horas. Em seguida, foi visualmente analisada a atividade metabólica do biofilme, por meio da utilização de resazurina (20 µL), para determinação da concentração eliminatória mínima sobre o biofilme (CEMB), definida como a menor concentração na qual não se observa atividade metabólica. Posteriormente, a biomassa dos biofilmes foi quantificada por meio da técnica de coloração com cristal violeta, seguida de leitura em espectrofotômetro a 490 nm (SIDRIM *et al.*, 2019).

5.4 Obtenção, processamento, desinfecção da pele porcina e formação da ferida.

A pele porcina foi coletada em abatedouro regulamentado, na cidade de Fortaleza, Ceará, e congelada até a realização do experimento (GUEDES *et al.*, 2021). A pele descongelada foi cortada em fragmentos de 2x2 cm, com uso de bisturi e esses foram armazenados em tubos falcons 50ml estéreis a -20 °C até o momento do uso. Para realização da desinfecção, foi utilizada a metodologia descrita por Yang *et al.*, (2013). Os fragmentos de pele foram deixados em temperatura ambiente para o descongelamento total. Em seguida, foram colocados com o auxílio de uma pinça estéril por 30 minutos em um frasco estéril contendo 50 mL de álcool etílico 70%. Depois foram transferidos para o frasco estéril contendo 50 mL de hipoclorito de sódio 0,615% por 30 minutos. Posteriormente, os fragmentos de pele foram colocados em um frasco estéril contendo 50 mL de água destilada por 30 minutos. Por último, 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 *punch* número 8 para delimitação das dimensões (BRACKMAN *et al.*, 2016). O *punch* foi introduzido até a derme e, em seguida, com o auxílio de um bisturi o tecido demarcado foi retirado (FIGURA 7).

5.5 Formação do biofilme na ferida e avaliação da ação da ciprofloxacina e PHMB sobre os biofilmes maduros formados em modelo *ex vivo*

Os biofilmes foram montados, segundo metodologia de Guedes *et al.*, (2021), com algumas alterações. Brevemente, as bactérias foram semeadas e incubadas a 37 °C um dia antes do experimento para crescimento dos micro-organismos. Os fragmentos de pele foram colocados individualmente em placa de Petri contendo ágar bacteriológico a 7 g/L para estabilização e hidratação. Os inóculos bacterianos foram preparados de acordo com a escala 6 de McFarland em tubos de hemólise contendo BHI caldo com 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. Após esse período, para avaliar o efeito da Ciprofloxacina e do PHMB sobre o biofilme *ex vivo*, cada ferida foi preenchida com gaze estéril de 1 cm² embebida com 100 µL de ciprofloxacina ou PHMB. A ciprofloxacina foi testada contra biofilmes maduros no modelo *ex vivo* nas concentrações de CEMB e 2x CEMB, sendo 2 µg/mL e 4 µg/mL e 8 µg/mL e 16 µg/mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Por outro lado, o PHMB foi utilizado

puro (100 $\mu\text{g/mL}$) para melhor reproduzir a sua utilização no tratamento de feridas na prática. Foram utilizados fragmentos de pele como controle de crescimento, que foram preenchidos com gaze estéril de 1 cm^2 embebida com 100 μL de soro fisiológico (SF) a 0,9% (FIGURA 8). As placas de Petri, contendo os fragmentos de pele, foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}$, por 24 horas (FIGURA 7). Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

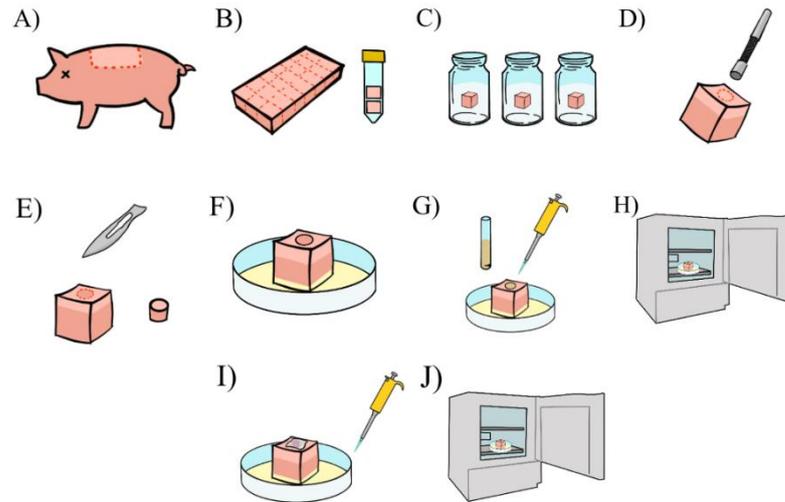


Figura 7: A) Retirado retalho de pele de animal abatido em abatedouro regulamentado; B) Corte do retalho em cubos de mesmo tamanho; C) Desinfecção das peles em 3 etapas; D) Delimitação do tamanho da ferida com punch #8; E) Confeção da ferida; F) Estabilização em ágar bacteriológico; G) Infecção da ferida; H) Incubação para formação do biofilme; I) Tratamento; J) Incubação para avaliar efeito do tratamento.

FONTE: Figura do autor

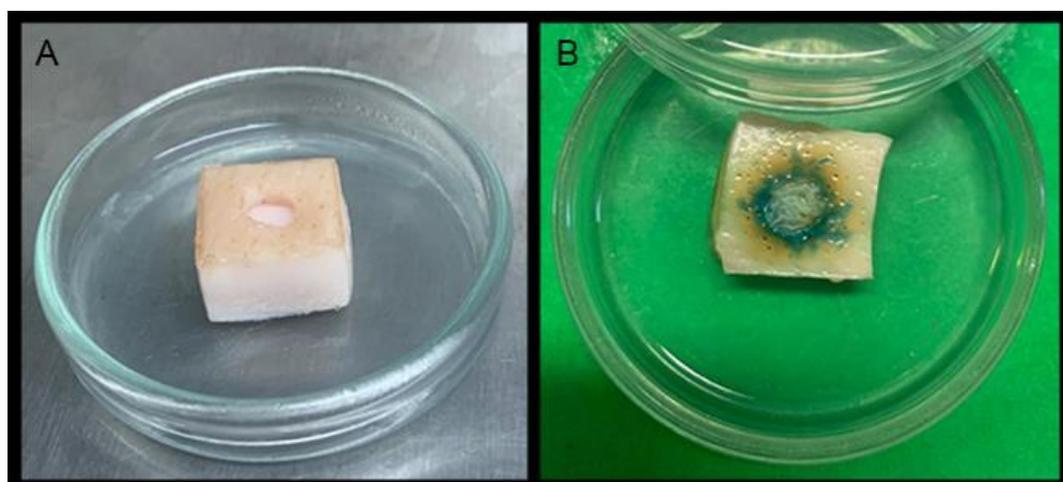


Figura 8. A- fragmento de pele porcina após processos de desinfecção e formação da ferida; B- fragmento de pele com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento com PHMB.

FONTE: Figura do autor

5.5.1 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Para a quantificação de UFC, a gaze de cada ferida foi retirada com pinça flambada, depois foram adicionados 50 μL de SF a 0,9% no leito da ferida, realizada a técnica de desbridamento *Square* para desestruturar o biofilme (BARKER *et al.*, 2017), que consiste em fazer pequenos cortes perpendiculares, e aspirados os 50 μL de SF a 0,9%. Em seguida, um *swab* de algodão foi introduzido perpendicularmente em cada ferida, rotacionado em 360°, duas vezes, e transferido para tubos contendo 1 mL de salina + *Tween* 20 (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) para desprendimento das células bacterianas. Os tubos foram agitados em vortex, por um minuto, posteriormente os *swabs* foram desprezados 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. Posteriormente, 10 μL das diluições 1:10.000 e 1:100.000 foram semeados, em duplicata, em ágar Muller Hinton e incubados a 37° C por 24 h, para a contagem de UFC.

5.5.2 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) dos biofilmes *ex vivo*

Para a análise da arquitetura e viabilidade dos biofilmes *ex vivo*, os biofilmes foram crescidos sobre os fragmentos de pele e, após serem tratados com o PHMB e a CEMB de ciprofloxacina, 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 ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) (SIDRIM *et al.*, 2020; GUEDES *et al.*, 2021).

5.5.3 Análise Estatística

Os dados foram avaliados inicialmente quanto à normalidade. Os dados com distribuição normal foram analisados com o teste t não pareado, enquanto aqueles com distribuição não paramétrica foram analisados com o teste de Mann-Whitney. Valores de p inferiores a 5% permitiram conclusões significativas.

6. RESULTADOS

6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Eliminatória Mínima em Biofilme (CEMB) de ciprofloxacina e PHMB *in vitro*.

Ambos os compostos inibiram o crescimento bacteriano. A CIM de ciprofloxacina foi de 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Para o PHMB, foi observada CIM de 0,78425 µg/mL contra *S. aureus* e de 6,25 µg/mL contra *P. aeruginosa*. (TABELA 1).

Ambas as cepas apresentaram maior tolerância aos compostos na forma de biofilme, quando comparada ao crescimento planctônico. Para ciprofloxacina, a CEMB foi 4 vezes maior que a CIM obtida contra *S. aureus* e 32 vezes maior que aquela obtida contra *P. aeruginosa*. Quanto ao PHMB, este eliminou o biofilme de *S. aureus* em concentração 16 vezes maior que a CIM (CEMB=12,5 µg/mL), mas não eliminou o biofilme de *P. aeruginosa* em nenhuma das concentrações testadas. (TABELA 1). No tocante à biomassa, nem a ciprofloxacina, nem o PHMB apresentaram a propriedade de desestruturá-la.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração eliminatória mínima sobre o biofilme (CEMB) da ciprofloxacina e do PHMB contra biofilmes de *Staphylococcus aureus* ATCC e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

Antimicrobiano / Concentração		Micro-organismo	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
PHMB (µg/mL)	CIM	0,78125	6,25
	CEMB	12,5	>25
Ciprofloxacina (µg/mL)	CIM	0,5	0,25
	CEMB	2	8

6.2 Efeito da ciprofloxacina e do PHMB sobre biofilmes em modelo *ex vivo*

Quanto à avaliação do efeito da ciprofloxacina e do PHMB sobre o biofilme crescido no modelo *ex vivo*, observou-se que ambos os compostos reduziram significativamente a contagem de UFC dos biofilmes de ambas as espécies bacterianas. No biofilme de *S. aureus*, ciprofloxacina proporcionou uma redução na contagem de UFC de

96% para CEMB ($P= 0.0040$) e 76% para 2xCEMB ($P=0.0010$). Em relação ao PHMB, a redução na contagem foi de 72% ($P=0.0003$), quando comparado ao controle de crescimento (GRÁFICO 1). Biofilmes expostos à ciprofloxacina apresentaram biomassa reduzida ($P = 0,0185$) e aumento do coeficiente de rugosidade ($P = 0,0016$) e relação superfície-volume ($P <0,0001$), quando comparados ao controle de crescimento, indicando que biofilmes expostos à ciprofloxacina são mais dispersos que o controle de crescimento. Por outro lado, os biofilmes expostos ao PHMB apresentaram biomassa menor ($P <0,0001$) e espessura média de toda a área ($P = 0,0028$) e maior coeficiente de rugosidade ($P <0,0001$) e relação superfície-volume ($P <0,0001$) do que o controle de crescimento não exposto, demonstrando estrutura mais delgada e menos homogênea (Figura 3).

O biofilme de *P. aeruginosa* tratado com ciprofloxacina apresentou redução na contagem de UFC de 88% na CEMB ($P= 0.0004$), e a concentração de 2xCEMB eliminou o biofilme ($P < 0.0001$). Quando tratado com PHMB, foi observada uma redução na contagem de UFC de 86% em relação ao controle ($P= 0.0064$) (GRÁFICO 1). As análises CLSM revelaram que a ciprofloxacina ($P = 0,0336$) e o PHMB ($P = 0,0057$) reduziram significativamente a biomassa do biofilme, quando comparados ao controle de crescimento não exposto, enquanto apenas o PHMB reduziu ($P = 0,0019$) a espessura média da biomassa de biofilmes tratados (GRÁFICO 2). Nem a ciprofloxacina nem o PHMB interferiram na homogeneidade do biofilme, conforme demonstrado pelo coeficiente de rugosidade e relação superfície-volume (GRÁFICO 2).

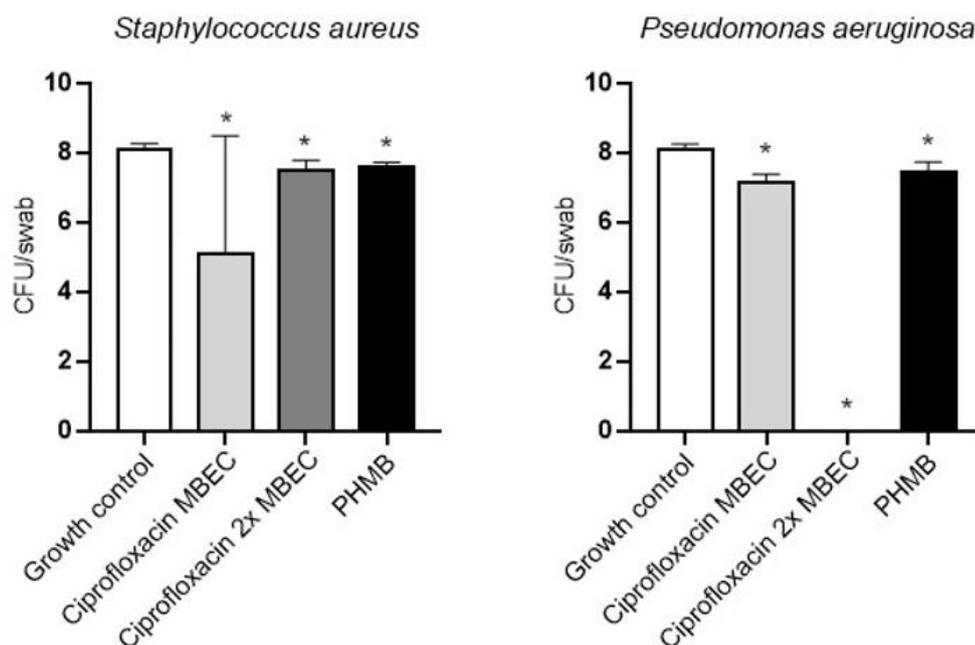


Gráfico 1. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa* crescidos em modelo *ex vivo* em pele. PHMB foi utilizado puro (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para melhor reprodução da prática clínica. Dados expressados em mean \pm SD (UFC/swab). Gráfico representado em log 10. * significa diferença significativa em relação ao controle de crescimento

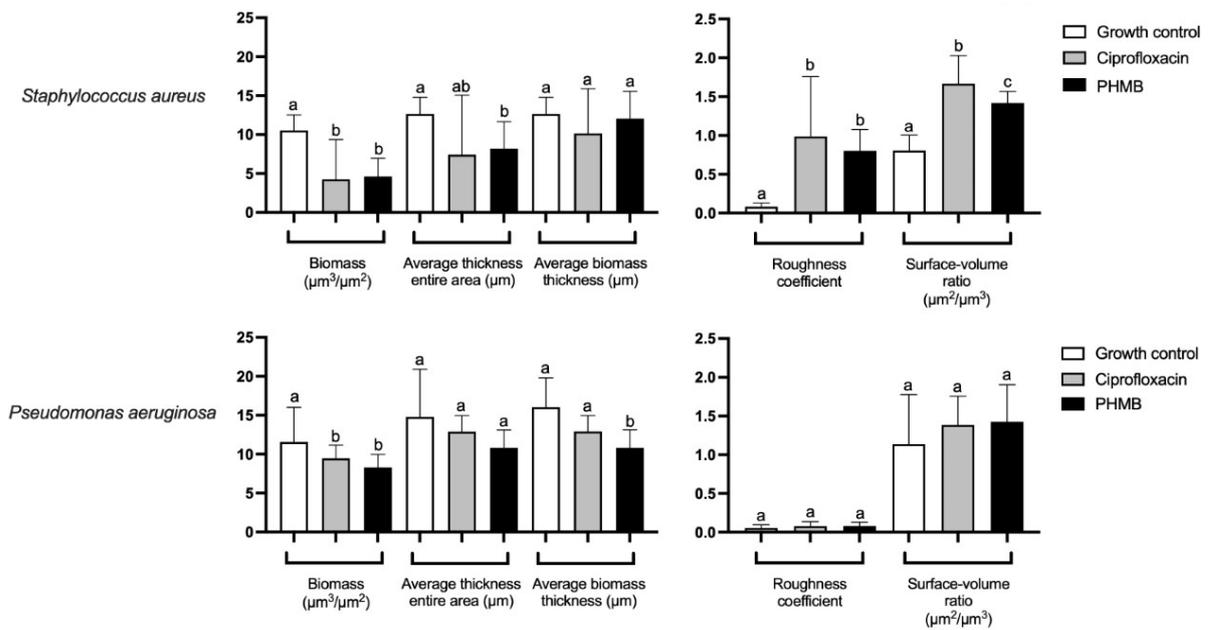


Gráfico 2: Análises microscópicas confocal de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* crescidos *ex vivo* em fragmentos de pele porcina. Imagens Z-stack foram adquiridas de 10 campos diferentes e analisadas com o software COMSTAT2™, utilizando laser 488 nm, que revela células vivas, coradas com SYTO9. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre biofilmes expostos a ciprofloxacina ou PHMB e o controle de crescimento.

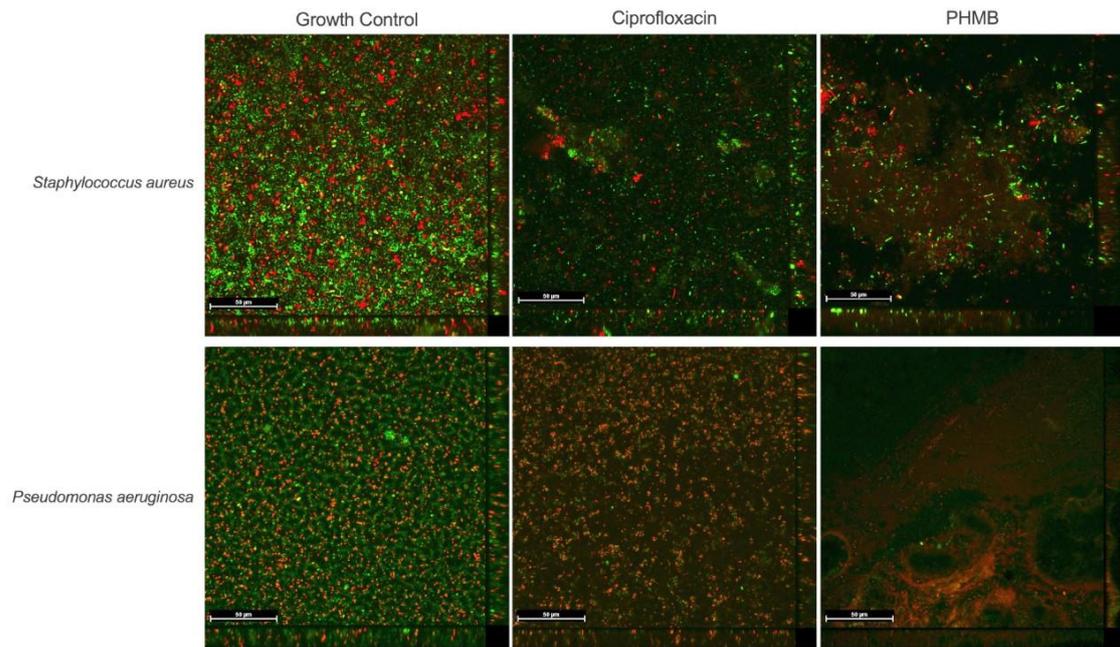


Figura 9: Microscopia confocal dos biofilmes bacterianos em modelo *ex vivo* após o tratamento com Ciprofloxacina, PHMB e o controle com soro fisiológico 0,9%. Quando coradas em verde, as células estão viáveis, quando em vermelho, as células tiveram sua parede danificada.

7. DISCUSSÃO

A presença de biofilmes em feridas está associada a prejuízos nas fases de granulação e epitelização e cronificação do estado inflamatório, conseqüentemente, retardando a cicatrização (METCALF *et al.*, 2013; VERSEY *et al.*, 2021). Ademais, os biofilmes promovem uma maior resistência aos tratamentos tópicos e sistêmicos, podendo gerar uma redução no sucesso terapêutico de aproximadamente 30% (WEI *et al.*, 2021; VERSEY *et al.*, 2021). Quando o objetivo é avaliar efeito antimicrobiano/antibiofilme, o modelo *ex vivo* apresenta vantagens em relação ao modelo *in vitro* por refletir como os micro-organismos crescem e se desenvolvem *in vivo* e mimetizar a geometria da ferida onde os nutrientes são fornecidos na base do biofilme e o oxigênio no ápice (BRACKMAN *et al.*, 2016; THAARUP *et al.*, 2021).

O modelo aqui apresentado trata-se de uma alternativa de baixo custo e fácil reprodução para o estudo de biofilmes em feridas. Uma revisão de Parnell *et al.* (2019) mostrou que quase 74% dos modelos utilizados para estudo de feridas são *in vivo*, 24% *in vitro* e apenas 2% utilizaram modelos *ex vivo*. Mesmo este último também apresentando limitações, principalmente no que tange a resposta imunológica e cicatrização, torna-se uma opção viável por oferecer uma maior semelhança histológica com a pele humana (ALVES *et al.*, 2018), fornecendo para os micro-organismos substrato de adesão e nutrientes que se assemelham ao observado em experimentos *in vivo* e no contexto clínico.

O trabalho de Guedes *et al.*, (2021) foi essencial para esse experimento pois forneceu os dados de condições ideais para o crescimento de biofilmes bacterianos na pele porcina, principalmente no que tange ao inóculo bacteriano e tempo e atmosfera de crescimento. Com isso, foi possível fazer modificações para avaliar o efeito antibiofilme de compostos no modelo *ex vivo*.

Nesse estudo, buscou-se padronizar um ensaio de sensibilidade de biofilmes microbianos crescidos em um modelo *ex vivo* de feridas crônicas para avaliar compostos com atividade antibiofilme. Para isso, optou-se por utilizar a ciprofloxacina e o PHMB para padronização do método. A ciprofloxacina é um antimicrobiano de amplo espectro utilizado em infecções de pele e partes moles, através da terapia oral e parenteral, e com potencial para se tornar curativo primário para o tratamento de feridas (RANCAN *et al.*, 2019; KOWALCZUK *et al.*, 2020). O PHMB, por sua vez, é um antisséptico utilizado na prática

clínica para limpeza de feridas, por ser classificado como "praticamente não tóxico", apresentar amplo espectro antimicrobiano, dificultar a adesão das células bacterianas e remover biofilmes *in vitro* e *in vivo* (HÜBNER, 2010; ZHENG *et al.*, 2021). Ambos os compostos são largamente utilizados na prática clínica e por isso foram usados aqui para validar a reprodutibilidade do modelo.

Tanto a ciprofloxacina quanto o PHMB foram capazes de inibir em 100% o crescimento *in vitro* dos micro-organismos na forma planctônica e, com aumento da concentração, a ciprofloxacina eliminou o biofilme maduro de *S. aureus* e de *P. aeruginosa*, enquanto o PHMB somente apresentou atividade eliminatória sobre o biofilme de *S. aureus*. A concentração máxima utilizada de PHMB (25 µg/mL) não matou o biofilme maduro de *P. aeruginosa*. Esse resultado também foi observado em um estudo de CHEN *et al.* (2021) em que o biofilme de *P. aeruginosa* foi mais resistente que o de *S. aureus* e sobreviveu 7 dias de tratamento com PHMB *in vitro*. Zheng *et al.* (2021), utilizando a mesma concentração, observou apenas uma redução na biomassa biofilme utilizando os mesmos microrganismos, porém, utilizando crescimento de 24 horas, o que pode influenciar no estágio de maturação.

No tocante aos resultados utilizando o modelo *ex vivo*, ambos os compostos diminuiram significativamente a quantidade de células associadas aos biofilmes. Apesar de a ciprofloxacina ser utilizada por via oral para tratamento de infecção de pele e de partes moles, esta não apresenta boa biodisponibilidade no leito da ferida, dificultando o seu uso sistêmico no manejo de feridas crônicas associadas a biofilmes, devido aos riscos de toxicidade e efeitos colaterais sistêmicos leves a severo, como náusea, diarreia, neuropatia periférica, convulsões, dentre outros (RANCAN *et al.*, 2019; THAI *et al.*, 2021). Assim, a utilização tópica da ciprofloxacina parece ser uma opção viável e eficaz, como demonstrado por ROY *et al.* (2015), utilizando a droga associada a coberturas de hidrogel *in vivo*. No presente estudo, observou-se que a aplicação tópica da ciprofloxacina diminuiu a quantidade de células associadas ao biofilme *ex vivo* em mais de 80%, usando a concentração de CEMB para os dois micro-organismos, além de matar o biofilme de *P. aeruginosa* na concentração 2x CEMB (16 µg/mL).

Quanto ao PHMB, apenas uma aplicação desse composto, por 24h, reduziu em mais de 70% a contagem de ambos os micro-organismos, corroborando com trabalho *in vitro* de Zheng *et al.* (2021). Isso pode advir da possibilidade de o modelo mimetizar a prática clínica, permitindo a realização do desbridamento da ferida, associado a uma cobertura primária com gaze. Ademais, a distribuição da droga pela gaze possibilitou o teste da real

eficácia do PHMB em tratamento tópico, ideal para o tratamento de feridas (RANCAN *et al.*, 2019). Aqui, podemos observar um maior efeito do PHMB sobre o biofilme de *Pseudomonas*, o que pode estar relacionado ao potencial elétrico dos componentes do biofilme. Além disso, a maior presença de proteínas disponíveis no modelo *ex vivo* pode explicar a diferença no efeito desse composto *in vitro* vs. *ex vivo*.

Assim, ambos os micro-organismos foram capazes de formar biofilme tanto *in vitro* quanto no modelo *ex vivo* aqui proposto, e apresentaram diferenças quanto a resposta do tratamento com compostos utilizados na prática clínica. Como os modelos *in vitro* apresentam menor semelhança com a ferida *in vivo*, o modelo se torna uma opção para o estudo de novas estratégias terapêuticas para biofilmes em feridas.

8. CONCLUSÃO

O modelo proposto mostrou-se uma alternativa econômica, facilmente reproduzível e que possibilita a mimetização de um tratamento de feridas, incluindo limpeza, desbridamento e curativo primário. Ambos os micro-organismos foram capazes de formar biofilme na ferida e a superfície possibilitou a adição de compostos para teste de efeito antibiofilme de maneira que o produto fosse distribuído e permanecesse no leito até o fim do tratamento. Tanto a Ciprofloxacina quanto o PHMB foram capazes de diminuir a quantidade de UFC e danificar a matriz dos biofilmes bacterianos. Existe uma lacuna na literatura acerca de modelos que utilizem desbridamento e curativo com gaze, todavia de acordo com os resultados, conclui-se que se trata de um modelo viável para estudo de biofilmes em feridas.

REFERÊNCIAS

ALHAJJ, M.; BANSAL, P.; GOYAL, A. Physiology, Granulation Tissue. *StatPearls*. 2020.

ALVES, D. R.; BOOTH, S. P.; SCAVONE, P.; SCHELLENBERGER, P.; SALVAGE, J.; DEDI, C.; THET, N.; JENKINS, A. T. A.; WATERS, R.; NG, K, W.; OVERALL, A. D. J.; METCALF, A. D.; NZAKIZWANAYO, J.; JONES, B. V. Development of a High-Throughput ex-Vivo Burn Wound Model Using Porcine Skin, and Its Application to Evaluate New Approaches to Control Wound Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. v. 8. 2018.

ALVES, P. J.; BARRETO, R. T.; BARROIS, B. M.; GRYSOON, 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. *Int Wound J*. v. 18, n. 3, p. 342-358. 2021.

AMANDO, B. R. Impregnação de cateteres urinários com inibidor de bombas de efluxo e moduladores de quorum sensing para a inibição de biofilmes bacterianos associados a infecção do trato urinário, *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2018.

ANDERSSON, M. A.; MADSEN, L. B.; SCHMIDTCHEN, A.; PUTHIA, M. Development of an Experimental Ex Vivo Wound Model to Evaluate Antimicrobial Efficacy of Topical Formulations. *Int J Mol Sci*. v. 22, n. 9. 2021.

BAIN, M. A.; THIBODEAUX, K. T.; SPEYRER, M. S.; CARLSON, E.; KOULLIAS. G. J. Effect of Native Type I Collagen with Polyhexamethylene Biguanide Antimicrobial on Wounds: Interim Registry Results. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. v. 7, n. 6. 2019.

BARKER, J. C.; KHANSA, I.; GORDILLO, G. M. A Formidable Foe is Sabotaging Your Results: What You Should Know about Biofilms and Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. v. 139, n. 5, p. 1184-1194. 2017.

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. *Int J Prev Med*. v. 11. 2020.

BOULTON, A. J. M. The Diabetic Foot. *Endotext*. 2020.

BRACKMAN, G.; COENYE, T. In Vitro and In Vivo Biofilm Wound Models and Their Application. *Adv Exp Med Biol*. v. 897, p. 15-32. 2016.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int J Inflamm*. 2019.

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.

CASTELO-BRANCO D.S.C.M.; SILVA A.L.; MONTEIRO A.J.; GUEDES G.M.M.; SALES J.A.; OLIVEIRA J.S.; MAIA JUNIOR J.E.; MIRANDA S.A.; ALENCAR L.P.; BRILHANTE R.S.N.; CORDEIRO R.A.; BANDEIRA T.J.P.G.; PEREIRA-NETO W.A.; ROCHA M.F.G. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species from scarlet ibis (*Eudocimus ruber*) and their environment: monitoring antimicrobial susceptibility and virulence. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 110, n. 1, p. 33-43, 2017.

CHEN, X.; LORENZEN, J.; XU, Y.; JONIKAITE, M.; THAARUP, I. C.; BJARNSHOLT, T.; KIRKETERP - MØLLER, K.; THOMSEN, T. R. A novel chronic wound biofilm model sustaining coexistence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* suitable for testing of antibiofilm effect of antimicrobial solutions and wound dressings. *Wound Repair Regen*. v. 29, n. 5, p. 820-829. 2021.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; approved standard, 27th ed. CLSI document M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLINTON, A.; CARTER, T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. *Laboratory Medicine*. v. 46, n. 4, p. 277-284. 2015.

DARWIN, E.; TOMIC-CANIC, M. Healing Chronic Wounds: Current Challenges and Potential Solutions. *Curr Dermatol Rep.* v. 7, n. 4, p. 296-302. 2018.

DHALL, S.; DO, D.; GARCIA, M.; WIJESINGHE, D. S.; BRANDON, A.; KIM, J.; SHANCHEZ, A.; LYUBOVITSKY, J.; GALLAGHER, S.; NOTHNAGEL, E. A.; CHALFANT, C. E.; PATEL, R. P.; SCHILLER, N.; MARTINS-GREEN, M. A Novel Model of Chronic Wounds: Importance of Redox Imbalance and Biofilm-Forming Bacteria for Establishment of Chronicity. *Plos One.* v. 9, n. 10. 2014.

EAGLE, M. Wound assessment: the patient and the wound. *Wound Essentials.* v. 4. 2009.

EDWARDS-JONES. Biofilm-based wound care: how to cleanse, debride and manage chronic wounds. *Wounds UK.* v. 14, n. 3. 2018

ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of Wound Healing. *Curr Dermatol Rep.* v. 7, n. 4, p. 350–358. 2018.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care.* v. 4, n. 9, p. 560–582. 2015.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews.* v. 29 n. 3, p. 153–162. 2015.

GONZALEZ, A. C. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* v. 91, n. 5, p. 614–620. 2016.

GRAVES, N.; ZHENG, H. The prevalence and incidence of chronic wounds: a literature review. *Wound Practice and Research.* v. 22, n. 1. 2014.

GUEST, J. F.; AYOUB, N.; MCILWRAITH, T.; UCHEGBU, I.; GERRISH, A.; WEIDLICH, D.; VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ Open.* v. 5, n. 12. 2015.

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*. v. x, p. 1, 2021.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther*. v. 34, n. 3, p. 599–610. 2017.

HERMAN, T. F.; BORDONI, B. Wound Classification. *StatPearls*. 2021.

HUBNER, N. O.; KRAMER, A. Review on the Efficacy, Safety and Clinical Applications of Polihexanide, a Modern Wound Antiseptic. *Skin Pharmacol Physiol*. v. 23. 2010.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE DIABETIC FOOT. The 2019 IWGDF Guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease [Internet]. International Working Group on the Diabetic Foot, 2019.

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. *Syst Rev*. v.5, n. 1. 2016.

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

JUNKA, A. F.; RAKOCZY, R.; SZYMCZYK M. B.; SEDGHIZADEH, P. P.; FIJALKOWSKI, K. Application of Rotating Magnetic Fields Increase the Activity of Antimicrobials Against Wound Biofilm Pathogens. *Scientific Reports*. v. 8. 2018.

KAISER, P.; WACHTER, J.; WINDBERGS, M. Therapy of infected wounds: overcoming clinical challenges by advanced drug delivery systems. *Drug Deliv Transl Res*. v. 11, n. 4, n. 1545–1567. 2021.

KAMARUZZAMAN, N. F.; CHONG, S. Q. Y.; EDMONDSON-BROWN, K. M.; NTOW-BOAHENE, W.; BARDIAU, M.; GOOD, L. Bactericidal and Anti-biofilm Effects of Polyhexamethylene Biguanide in Models of Intracellular and Biofilm of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. *Front Microbiol.* v. 8. 2017.

KANGAL, M. K. O.; REGAN, J. Wound Healing. *StatPearls.* 2021.

KIM, D.; NAMEN, W.; MOORE, J.; BUCHANAN, N.; HAYES, V.; MYNTTI, M. F.; HAKAIM, A. Clinical Assessment of a Biofilm-disrupting Agent for the Management of Chronic Wounds Compared With Standard of Care: A Therapeutic Approach. *Wounds.* v. 30, n. 5. 2018.

KLEIN, P.; SOJKA, M.; KUCERA, J.; MATONOHOVA, J.; PAVLIK, V.; NEMEC, J.; KUBICKOVA, G.; SLAVKOVSKY, R.; SZUSZKIEWICZ, K.; DANEK, P. A porcine model of skin wound infected with a polybacterial biofilm. *Biofouling.* v. 34, n. 2, p. 226-236, 6 fev. 2018.

KOWALCZUK, D.; MIAZGA-KARSKA, M.; GLADYSZ, A.; WARDA, P.; BARANSKA, A.; DROP, B. Characterization of Ciprofloxacin-Bismuth-Loaded Antibacterial Wound Dressing. *Molecules.* v. 25. 2020.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* v. 73, n. 20, p. 3861–3885. 2016.

LEI, M. G.; GUPTA, R. K.; LEE, C. Y. Proteomics of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix in a rat model of orthopedic implant-associated infection. *PLoS One.* v. 12, n. 11. 2017.

LI, H.; WILLIAMS, G. R.; WU, J.; LV, Y.; SUN, X.; WU, H.; ZHU, L. Thermosensitive nanofibers loaded with ciprofloxacin as antibacterial wound dressing materials. *International Journal of Pharmaceutics.* v. 517, p. 135–147. 2017

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

MALONE, M.; TERRY, S. Biofilm-based wound care: the importance of debridement in biofilm treatment strategies. *British Journal of Community Nursing*. v. 22, n. 6, p. 20–S25. 2017b.

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 metaanalysis of observational studies. *Annals of Epidemiology*. 2018.

MERVIS, J. S.; PHILLIPS, T. J. Pressure ulcers: Pathophysiology, epidemiology, risk factors, and presentation. *J Am Acad Dermatol*. v. 81, n. 4, p. 881-891. 2019.

METCALF, D. G.; BOWLER, P. G. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns Trauma*. v. 1, n. 1, p. 5-12. 2013.

MILLER, M. W.; EMENY, R. T.; SNIDE, J. A.; FREED, G. L. Patient-specific factors associated with pressure injuries revealed by electronic health record analyses. *Health Informatics J*. v. 26, n. 1, p. 474-485. 2019.

MONDRAGON, N.; ZITO, P. M. Pressure Injury. *StatPearls*. 2021.

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

NUNAN, R.; HARDING, K. G.; MARTIN, P. 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.

NUSSBAUM, S. R.; CARTER, M. J.; FIFE, C. E.; DAVANZO, J.; HAUGHT, R.; NUSGART, M.; CARTWRIGHT, D. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. 2017.

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.

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

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*. 2018.

PARNELL, L. K. S.; VOLK, S. W. The Evolution of Animal Models in Wound Healing Research: 1993–2017. *Advances In Wound Care*, v. 8, n. 12, p. 692-702, 2019.

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

POWERS, J. G.; HIGHAM, C.; BROUSSARD, K.; PHILLIPS, T. J. Wound healing and treating wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v. 74, n. 4, p. 607–625. 2016.

PHILLIPS, C. J.; HUMPHREYS, I.; FLETCHER, J.; HARDING, K.; CHAMBERLAIN, G.; MACEY, S. Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. *Int Wound J*. v. 13, n. 6, p. 1193–1197. 2016.

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*. v. 10, n. 1. 2020.

RANCAN, F.; CONTARDI, M.; JURISCH, J.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A.; BAYER, I. S.; SCHAUDINN, C. Evaluation of Drug Delivery and Efficacy of Ciprofloxacin-Loaded Povidone Foils and Nanofiber Mats in a Wound-Infection Model Based on Ex Vivo Human Skin. *Pharmaceutics*. v. 11, n. 9. 2019.

REGULSKI, M.; JAMES, G.; AVERA, E.; MYNNTTI, M. F. Extracellular Matrix Graft with PHMB Versus High Osmolarity Surfactant. *J Dermatol & Ther.* v. 2, n. 1, p. 39-42. 2018

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; SUN, Y.; DOWD, S. E. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 3, p. 2535-2550. 2012.

ROBLES-TENORIO, A.; LEV-TOV, H.; OCAMPO-CANDIANI, J. Venous Leg Ulcer. *StatPearls*. 2021.

RONDINELLI, J.; ZUNIGA, S.; KIPNIS, P.; KAWAR, L. N.; LIU, V.; ESCOBAR, G. J. Hospital-Acquired Pressure Injury. *Nurs Res.* v. 67, n. 1, p. 16-25. 2018.

ROY, D. C.; TOMBLYN, S.; BURMEISTER, D. M.; WRICE, N. L.; BECERRA, S. C.; BURNETT, L. R.; SAUL, J. M.; CHRISTY, R. J. Ciprofloxacin-Loaded Keratin Hydrogels Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Support Healing in a Porcine Full-Thickness Excisional Wound. *Adv Wound Care.* v. 4, n. 8, p. 457–468. 2015

SCHULTZ, G.; BJARNSHOLT, T.; JAMES, G. A.; LEAPER, D. J.; MCBAIN, A. J.; MALONE, M.; STOODLEY, P.; SWANSON T.; TACHI, M.; WOLCOTT, R. D. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair And Regeneration.* v. 25, n. 5, p. 744-757. 2017.

SEN, C. K. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Adv Wound Care (New Rochelle).* v. 8, n. 2, p. 39–48. 2019

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.

SUHAERI, M.; NOH, M.; MOON, J.; KIM, I.; OH, S.; HA, S.; LEE, J.; PARK, K. Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing. *Theranostics.* v. 8, n. 18, p. 5025–5038. 2018.

THAARUP, I. C.; BJARNSHOLT, T. Current in vitro biofilm-infected chronic wound models for developing new treatment possibilities. *Advances in Wound Care*. v. 10, n. 2, p. 91-102. 2021.

THAI, T.; SALISBURY, B. H.; ZITO, P. M. Ciprofloxacin. *StatPearls*. 2021.

VERSEY, Z.; NIZER, W. S. C.; RUSSELL, E.; ZIGIC, S.; DEZEEUW, K. G.; MAREK, J. E.; OVERHAGE, J.; CASSOL, E. Biofilm-Innate Immune Interface: Contribution to Chronic Wound Formation. *Front Immunol*. 2021.

WALLACE, H. A.; BASEHORE, B. M.; ZITO, P. M. Wound Healing Phases. *StatPearls*. 2021.

WEI, D.; ZHU, X.; CHEN, Y.; LI, X.; CHEN, Y.; LIU, H.; ZHANG, M. Chronic wound biofilms: diagnosis and therapeutic strategies. *Chin Med J (Engl)*. v. 132, n. 22, p. 2737-2744. 2019.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*. v. 10, n. 9. 2020.

WOLCOTT, R.D.; RHOADS, D. D.; DOWD, S. E. Biofilms and Chronic Inflammation. *J Wound Care*. v. 17, n. 8, p. 333-41. 2008.

WU, Y.; CHENG, N.; CHENG, C. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. *Trends in Biotechnology*. 2018.

YADAV, M. K.; CHAE, S. W.; GO, Y. Y.; IM, G. J.; SONG, J. J. In vitro multi-species biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and their host interaction during in vivo colonization of an otitis media rat model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 7. 2017.

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.

ZHAO, R.; LIANG, H.; CLARKE, E.; JACKSON, C.; XUE, M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci*. v, 17, n. 12, p. 2085. 2016.

ZHENG, Y.; WANG, D.; MA, L. Z. Effect of Polyhexamethylene Biguanide in Combination with Undecylenamidopropyl Betaine or PslG on Biofilm Clearance. *International Journal of Molecular Sciences* v. 22, n. 2. 2021.