

Análise do potencial de inibição de formação de biofilme da Sinvastatina contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* de pacientes diagnosticados com dermatite atópica.

Palavras-Chave: DERMATITE ATÓPICA, BIOFILMES, SINVASTATINA.

Matheus Augusto Germano, FCF, UNICAMP
Sindy Magri Roque (Co-orientadora) FCF, UNICAMP
Profa. Dra. Karina Cogo Müller (Orientadora), FCF, UNICAMP

INTRODUÇÃO

A Dermatite Atópica (DA) é uma doença crônica inflamatória multifatorial que está relacionada a fatores como a disbiose microbiana, e desequilíbrio da resposta imunológica e fatores genéticos que levam a um comprometimento da função de barreira da pele (WEIDINGER et al., 2018; MELEDATHU et al., 2025)

O microrganismo mais comum relatado na literatura é *Staphylococcus aureus* nas lesões (TOTTÉ et al., 2016; GEOGHEGAN et al., 2018), entretanto o papel da formação de seu biofilme na DA ainda é pouco investigado. Contudo, estudos já relataram que a presença de biofilme de *Staphylococcus sp* na pele de pacientes com dermatite atópica e sua relação com a severidade da doença (GONZALEZ et al., 2017; GONZALEZ et al., 2021; BLICHARZ et al., 2021).

Após sua formação, estas estruturas são altamente resistentes a antimicrobianos e capazes de realizar escape do sistema imunológico do hospedeiro, o que os torna difíceis de serem eliminados. Além do mais, a presença do biofilme pode facilitar a transferência de genes de resistência a antibióticos entre as bactérias, contribuindo para a sua disseminação, além de contribuir para persistência da infecção (Almatroudi et al., 2025; GONZALEZ et al., 2017; BLICHARZ et al., 2021).

Os tratamentos convencionais para a DA incluem múltiplos esteróides tópicos, inibidores tópicos da calcineurina, e antibióticos tópicos como a mupirocina, além de terapias sistêmicas (PASCOLINI et al., 2011; NAKAGAWA et al., 2020; Bessa et al., 2016; LAZAR et al., 2024). No entanto, o uso a longo prazo de corticosteróides deve ser evitado devido à escassez de estudos pediátricos (CARVALHO et al., 2017). Além disso, de forma geral, a descontinuação da terapia tradicional pode resultar em recolonização bacteriana, o que pode aumentar a resistência aos antibióticos (CHONG et al., 2016; LEE E VAN BEVER 2014), assim, o reposicionamento de fármacos se torna uma estratégia fundamental para contornar esses obstáculos.

Dessa forma, o presente trabalho analisou o potencial de inibição de formação de biofilme da sinvastatina para o tratamento de dermatite atópica, para que a partir desse estudo, possam ser geradas evidências para oferecer uma abordagem terapêutica alternativa e inovadora no futuro para o controle de infecções tópicas bacterianas.

METODOLOGIA:

Desenho experimental e considerações éticas

O presente estudo está inserido em um ensaio clínico randomizado duplo-cego, placebo controlado, cruzado realizado no ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (CEP) sob parecer nº 36550820.6.0000.5404.3.1. Foram incluídos participantes pediátricos e adultos com o diagnóstico de DA em seguimento no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp.

Coleta das cepas clínicas.

As cepas clínicas foram isoladas a partir de amostras coletadas de pacientes que atendiam aos critérios de inclusão, os quais foram previamente orientados a não realizar a higienização da região antes da coleta. No momento da coleta, as amostras de pele foram obtidas com swabs estéreis em ponta de poliéster (Swab, Copan), previamente imersos em uma solução de NaCl 0,9% e Tween 0,1%. Os swabs foram então friccionados firmemente na lesão-alvo por 10 vezes, cobrindo

uma área 8 cm² em adultos e 4 cm² em crianças (NIEMEYER-VAN DER KOLK 2020). Após o esfregaço, os swabs foram acondicionados em seus devidos tubos originais imersos na solução referida (BLANCHET-RÉTHORÉ et al., 2017).

Após a coleta, em um período de 6 horas as amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio seletivo ágar manitol-sal e ágar sangue e incubadas por até 48 h em aerobiose à 37°C. Para a confirmação da identificação de *S. aureus* e *S. epidermidis* a partir do meio de cultura sal manitol, colônias foram crescidas em caldo (*Tryptone Soy Agar*; Difco Co., Detroit, MI, USA) TSB (*Tryptone Soy Broth*, Difco Co., Detroit, MI, USA) e em meio TSA por 24 h a 37°C. A partir desse crescimento, foram realizados os testes bioquímicos e caracterização por qPCR.

Bactérias padrão e condições de cultivo

As seguintes cepas de microrganismos foram utilizadas como padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA; gene *mecA* presente) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. As culturas foram armazenadas em meio Tryptic Soy Broth (TSB; Difco Co., Detroit, MI, USA) suplementado com 20% de glicerol, a -80 °C. Para uso, foram cultivadas em meio Tryptone Soy Agar (TSA; Difco Co., Detroit, MI, USA) e incubadas em condições de aerobiose a 37 °C.

Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada utilizando concentrações de sinvastatina entre 500 µg/mL e 0,24 µg/mL segundo as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* - Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e analisadas pela absorbância em um espectrofotômetro a 660 nm. Além disso, 30 µL de corante resazurina 0,01% (Inlab, Diadema, SP, Brasil) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por duas horas e inspecionadas visualmente para confirmar os resultados obtidos. A menor concentração do composto que não apresentou turbidez foi considerada a CIM.

Teste inibição de formação de biofilme.

Para avaliar a capacidade de inibição de biofilme foi desenvolvido o procedimento conforme desenvolvido por Ferreira et al., 2021 com modificações. Serão adicionados 180 µL de caldo *BHI* (*Brain Heart Infusion*, Difco), suplementado com 1% glicose (Isofar; Duque de Caxias, RJ, Brasil), e posteriormente no primeiro poço será adicionado 100 µL de uma solução preparada com sinvastatina na concentração inicial de 500 µg/mL, para ser realizada uma diluição seriada ao longo da placa. Posteriormente foi adicionado 20 µL de uma suspensão bacteriana em salina estéril correspondente ao padrão 0,5 de McFarland. As placas passaram por incubação a 37°C por 24 horas sem agitação. O sobrenadante foi retirado, para que o biofilme fosse fixado a 60°C por 1 hora, corado com cristal violeta 2% (p/v) por 30 minutos e descorado com etanol 95% (v/v) por 30 minutos. A densidade óptica (DO) de cada poço corado com cristal violeta foi medida a 570 nm usando um espectrofotômetro de microplacas.

Análise estatística

Para a análise dos dados de inibição de biofilme, foi realizado o teste de variância (ANOVA de um critério, paramétrico), seguido do pós-teste de *Tukey* para comparação das médias e identificação das diferenças estatisticamente significantes. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* (*GraphPad Software, Boston, MA, USA*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de concentração inibitória mínima da Sinvastatina.

No ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram testadas concentrações de sinvastatina entre 500 µg/mL e 0,24µg/mL para cinco cepas clínicas, além das cepas padrão usadas para controle MSSA (ATCC 29213) e MRSA (ATCC 43300), os resultados estão apresentados no quadro 01. Todas as cepas clínicas, assim como, a cepa MRSA obtiveram valor de 62,5 µg/mL, sendo acima do valor obtido para cepa sensível, mas comparável a cepa resistente.

Quadro 01. Resultados Experimentais do Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em para cepas de *S. aureus*. Concentrações expressas em µg/mL

Cepa	ATCC 29213	ATCC 43300	p03	p05	p07	p08
Concentrações em µg/mL	31,25	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5

Estudos anteriores do nosso grupo encontraram valores de CIM para essa espécie na faixa de 15,62 – 31,25 µg/mL (GRAZIANO et al., 2015; DA SILVA et al., 2024), para as cepas MSSA, entretanto, as cepas clínicas e MRSA (ATCC 43300) apresentaram valores superiores. Esses resultados podem ser corroborados com trabalhos que avaliaram a atividade

antibacteriana da sinvastatina isolada e em associação com nanopartículas de prata (AgnP) contra cepas resistentes de *S.aureus* como a ATCC 43300 e ATCC 33591 (ROQUE et al., 2024)

Para as cepas de *S. epidermidis*, o fármaco foi testado nas mesmas concentrações e condições, foram selecionadas três cepas clínicas, além da cepa padrão (ATCC 12228), os valores se encontram no Quadro 02.

Quadro 02. Resultados Experimentais do Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cepas de *S. epidermidis*. Concentrações expressas em µg/mL

Cepa	ATCC 12228	p09	p10	p12
Concentrações em µg/mL	31,25	31,25	31,25	31,25

Em relação cepas *S. epidermidis* todas apresentaram sensibilidade a ação do fármaco, sendo obtidos valores de CIM de 31,25 µg/mL, estando em acordo com um estudo que avaliou a eficácia da sinvastatina em cepas de *S. epidermidis* e apresentaram a mesma faixa encontrada (MASADEH et al., 2012).

4.4 Inibição de formação de biofilme com sinvastatina

Para esse ensaio foram submetidos 13 isolados clínicos de *S. aureus* (p001-p13) e 3 isolados clínicos de *S. epidermidis*, além das cepas padrão utilizadas no projeto. Nesse ensaio, a formação inicial de biofilme foi avaliada com a exposição das substâncias após 24 h com diferentes concentrações das substâncias 8xCIM (500 µg/mL) à 1/16CIM (3,90 µg/mL) para cepas de *S. aureus*, e 16xCIM (500 µg/mL) a 1/8CIM (3,90 µg/mL) para os isolados de *S. epidermidis*.

A Figura 1 apresenta os valores de densidade óptica do biofilme de *S. aureus* em função das concentrações testadas. Para a cepa padrão MSSA (Figura 1A), a sinvastatina apresentou efeito inibitório significativo sobre a formação de biofilme em concentrações a partir de 1/32 da CIM ($p < 0,05$; ANOVA, pós-teste de Tukey). Para a cepa padrão MRSA, a sinvastatina também reduziu significativamente a formação de biofilme em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,05$; ANOVA, pós-teste de Tukey).

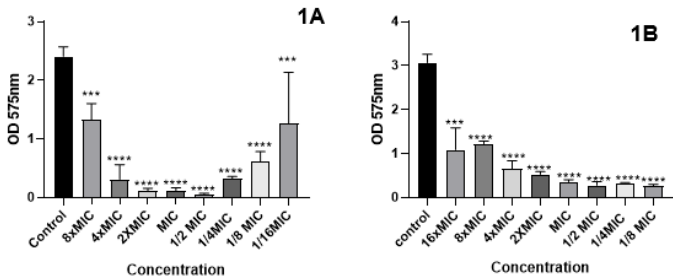
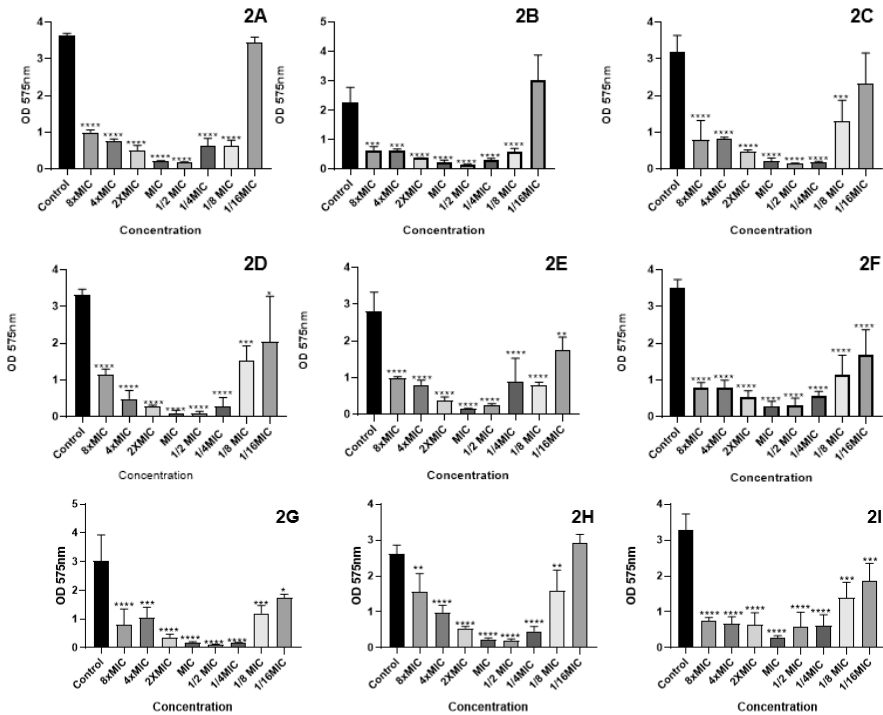


Figura 1 – Ensaio de inibição de biofilme de *S. aureus*, sendo 1A: ATCC 43300; 1B: ATCC 29213, em exposição sinvastatina por 24 h. A quantidade de biofilme formada está representada por valores de média e desvio padrão da densidade óptica (575 nm). Os símbolos *, ** ; * representa diferença estatística em concentração teste relação ao grupo controle negativo ($p<0,05$, ANOVA, Tukey)**



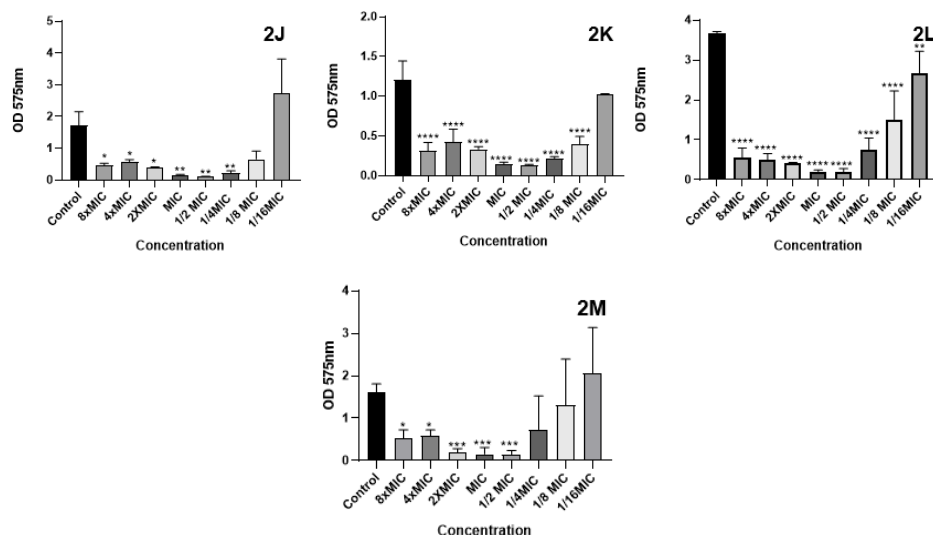


Figura 2 – Ensaio de inibição de biofilme de *S. aureus*, sendo 2A-2M: cepas clínicas de pacientes diagnosticados com dermatite atópica, em exposição sinvastatina por 24 h. A quantidade de biofilme formada está representada por valores de média e desvio padrão da densidade óptica (575 nm). Os símbolos *, ** ; * representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p<0,05$, ANOVA, Tukey)**

Em relação ao efeito inibitório da sinvastatina em cepas padrão foi observado um potencial de inibição de biofilme que seria independente da atividade bactericida, uma vez que, foram encontradas inibições significativas em concentrações sub-inibitórias, como $\frac{1}{4}$ CIM e $\frac{1}{8}$ CIM, resultado alinhado com literatura, como o estudo de Graziano et al. (2015) que observou em concentrações sub-CIM as células bacterianas conseguiram aderir, entretanto, não conseguiram se desenvolver para a formação de microcolônias e produção intensa de EPS, ou seja, não houve o amadurecimento de sua arquitetura tridimensional.

Ao analisar as cepas clínicas temos que 100% das cepas foram inibidas significativamente na concentração da CIM, ainda, aproximadamente 85% das mesmas a inibição foi encontrada em concentrações sub inibitórias, como $\frac{1}{4}$ CIM e $\frac{1}{8}$ CIM, resultado que respaldado com um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa que também demonstrou essa inibição em cepas isoladas de hemoculturas. (SILVA et al. 2024)

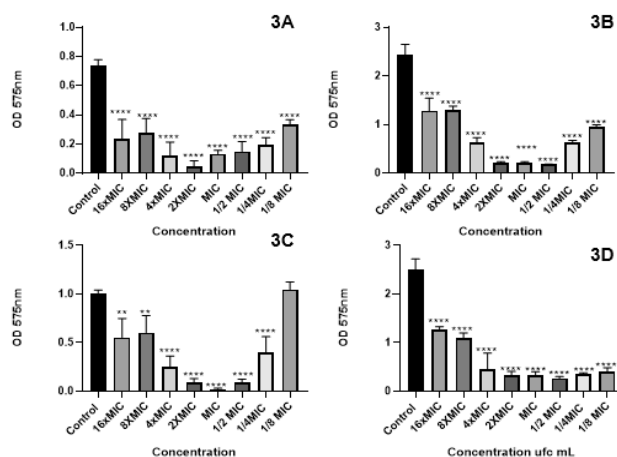


Figura 3 – Ensaio de inibição de biofilme de *S. epidermidis* sendo 3A a cepa padrão utilizada e 3B-3D: cepas clínicas de pacientes diagnosticados com dermatite atópica, em exposição sinvastatina por 24h. A quantidade de biofilme formada está representada por valores de média e desvio padrão da densidade óptica (575 nm). Os símbolos *, ** ; * representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p<0,05$, ANOVA, Tukey)**

A sinvastatina conseguiu inibir de maneira significativa formação do biofilme em concentrações 16 CIM (500 μ g) até $\frac{1}{8}$ CIM (3,90 μ g). Ao analisar as cepas clínicas (Figura 3B- 3D) todas foram inibidas significativamente na concentração de CIM, ademais, em 2 cepas ainda foram encontradas inibições em concentrações sub inibitórias, como $\frac{1}{2}$ CIM.

Ainda são escassos estudos que analisam a inibição de biofilme da sinvastatina em cepas de *S. epidermidis*, porém, evidências já estabeleceram seu efeito modulador de biofilme em outras bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*. (SILVA et al. 2024). Os microrganismos analisados, *S. epidermidis* assim como *S. aureus* têm a produção de PIA regulado pelo operon icaADBC, desta forma compartilhando mecanismo semelhante para formação da matriz extracelular (PINHEIRO et al. 2016) O mecanismo de ação das estatinas contra biofilmes continua em investigação, entretanto, o resultado observado pode estar

relacionado com o efeito da sinvastatina na via do mevalonato, como discutido por Cortes et al. (2025), que modula a biossíntese de isoprenóides bacterianos, afetando diretamente a integridade da membrana celular e processos de sinalização celular, como o quorum sensing.

Tanto os valores encontrados de CIM, quanto os valores de inibição de biofilme, apresentaram concentrações de inibição para a sinvastatina cerca de 1000 vezes maiores do que o valor médio quantificado em plasma em terapias para dislipidemia (BJORKHEM-BERGMAN et al., 2011; BERGMAN et al., 2011). Devido a isso, é justificado seu uso em formulações tópicas, já que concentrações do fármaco por via oral não atingem a concentração inibitória mínima. Entretanto, ainda se faz necessário mais estudos sobre sua penetração transdérmica e novos mecanismos de otimização moleculares do fármaco visando contornar dificuldades de solubilização, devido seu caráter lipofílico.

CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que a sinvastatina foi eficaz no controle da formação de biofilme por cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* isoladas de pacientes com dermatite atópica (DA). Observou-se um efeito dose-dependente na redução da formação de biofilme, inclusive em concentrações subinibitórias, destacando o potencial da sinvastatina como uma estratégia adjuvante no controle de infecções cutâneas associadas a biofilmes.

BIBLIOGRAFIA

- Almatroudi, A. **Biofilm Resilience: Molecular Mechanisms Driving Antibiotic Resistance in Clinical Contexts**. Biology 2025, 14, 165.
- BERGMAN, P. et al. **Studies on the antibacterial effects of statins - in vitro and in vivo**. PloS one, v. 6, n. 8, p. e24394, 2011.
- BESSA, G. R. et al. **Staphylococcus aureus resistance to topical antimicrobials in atopic dermatitis**. Anais brasileiros de dermatologia, v. 91, n. 5, p. 604–610, 2016.
- BJÖRKHEM-BERGMAN, L.; LINDH, J. D.; BERGMAN, P. **What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects?**: Letter to the Editors. British journal of clinical pharmacology, v. 72, n. 1, p. 164–165, 2011..
- BLANCHET-RÉTHORÉ, S. et al. **Effect of a lotion containing the heat-treated probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 on *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis**. Clinical, cosmetic and investigational dermatology, v. 10, p. 249–257, 2017.
- BLICHARZ, L. et al. **The influence of microbiome dysbiosis and bacterial biofilms on epidermal barrier function in atopic dermatitis-an update**. International journal of molecular sciences, v. 22, n. 16, p. 8403, 2021.
- Blicharz L, Michalak M, Szymanek-Majchrzak K, Młynarczyk G, Skowroński K, Rudnicka L, Samochocki Z. **The Propensity to Form Biofilm in vitro by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares of Patients with Atopic Dermatitis: Clinical Associations**. Dermatology. 2021;237(4):528-534
- CARVALHO, V. O. et al. **Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte II: abordagem terapêutica**. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. Arquivos de Asmas Alergia e Imunologia, v. 1, n. 2, 2017.
- CHONG, M.; FONACIER, L. **Treatment of eczema: Corticosteroids and beyond**. Clinical reviews in allergy & immunology, v. 51, n. 3, p. 249–262, 2016.
- CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15o Suplemento Informativo**. M100 - S15. ed. [S. I.]: ANVISA, 2005.
- CORTÊS, I. T.; SILVA, K. DE P.; COGO-MÜLLER, K. **Effects of simvastatin on the mevalonate pathway and cell wall integrity of *Staphylococcus aureus***. Journal of applied microbiology, v. 136, n. 1, 2025.
- DA SILVA, A. C. F. et al. **Modulation of staphylococcus aureus biofilm formation through subinhibitory concentrations of biogenic silver nanoparticles and simvastatin**. Future Pharmacology, v. 4, n. 1, p. 3–16, 2024.
- FERREIRA, Magda et al. **Liposomes as a nanoplatform to improve the delivery of antibiotics into *Staphylococcus aureus* biofilms**. Pharmaceutics, v. 13, n. 3, p. 321, 2021.
- GONZALEZ, T. et al. **Biofilm propensity of *Staphylococcus aureus* skin isolates is associated with increased atopic dermatitis severity and barrier dysfunction in the MPAACH pediatric cohort**. Allergy, v. 76, n. 1, p. 302–313, 2021.
- GONZALEZ, T. et al. **Staphylococcal biofilms in atopic dermatitis**. Current allergy and asthma reports, v. 17, n. 12, 2017.
- GRAZIANO, T. S. et al. **Statins and antimicrobial effects: Simvastatin as a potential drug against staphylococcus aureus biofilm**. PloS one, v. 10, n. 5, p. e0128098, 2015.
- Lazar M, Zhang AD, Vashi NA. **Topical Treatments in Atopic Dermatitis: An Expansive Review**. J Clin Med. 2024 Apr 10;13(8):2185. doi: 10.3390/jcm13082185. PMID: 38673458; PMCID: PMC11050343.
- LEE, M.; VAN BEVER, H. **The role of antiseptic agents in atopic dermatitis**. Asia Pacific allergy, v. 4, n. 4, p. 230–240, 2014.
- Meledathu S, Naidu MP, Brunner PM. Update on atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2025 Apr;155(4):1124-1132. doi: 10.1016/j.jaci.2025.01.013. Epub 2025 Jan 22. PMID: 39855361.
- MASADEH, M. et al. **Antibacterial activity of statins: a comparative study of Atorvastatin, Simvastatin, and Rosuvastatin**. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, v. 11, n. 1, p. 13, 2012.
- NAKAGAWA, H. et al. **Delgocitinib ointment, a topical Janus kinase inhibitor, in adult patients with moderate to severe atopic dermatitis: A phase 3, randomized, double-blind, vehicle-controlled study and an open-label, long-term extension study**. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 82, n. 4, p. 823–831, 2020.
- NIEMEYER-VAN DER KOLK, T. et al. **Pharmacodynamic effects of topical omiganan in patients with mild to moderate atopic dermatitis in a randomized, placebo-controlled, phase II trial**. Clinical and translational science, v. 13, n. 5, p. 994–1003, 2020.
- PASCOLINI, C. et al. **Molecular and immunological characterization of *Staphylococcus aureus* in pediatric atopic dermatitis: implications for prophylaxis and clinical management**. Clinical & developmental immunology, v. 2011, p. 718708, 2011.
- PINHEIRO, L. et al. ***Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital**. Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 86, n. 1, p. 11–14, 2016.
- WEIDINGER S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. **Atopic dermatitis**. Nat Rev Dis Primers. 2018 Jun 21;4(1):1