

Imunologia & Doenças Infecciosas e Parasitárias

EDIÇÃO VIII

Capítulo 6

SABONETES ANTISSEPTICOS NO CONTROLE DE BIOFILME POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE À METICILINA

MARIELY DE SOUZA PRUDÊNCIO¹
TAYLA CRISTINA OLIVEIRA ZANCANARO¹
DIANA LIZ JIMENEZ ROLÃO²
ADRIANA ARAÚJO DE ALMEIDA APOLONIO³
CLEISON DA ROCHA LEITE⁴
JOÃO VICTOR DE ANDRADE DOS SANTOS⁴
PAMELLA FUKUDA DE CASTILHO⁵
FABIANA GOMES DA SILVA DANTAS⁶
KELLY MARI DE OLIVEIRA PIRES⁶

1. Discente – Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.
2. Discente – Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados.
3. Doutora – Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
4. Discente – Doutorado em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados.
5. Doutora – Doutorado em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados.
6. Docente – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados.

Palavras-chave

Antimicrobianos; Pele Suína; Bactericida.

DOI

10.59290/5132700802

EP EDITORA
PASTEUR

INTRODUÇÃO

As infecções de pele e tecidos moles são condições frequentes que acometem milhões de pessoas ao redor do mundo, variando desde manifestações superficiais, como impetigo e abscessos, até complicações mais severas, como celulite e fascite necrosante. Dentre os patógenos mais prevalentes, *Staphylococcus aureus* se destaca, uma bactéria gram-positiva comensal da pele e das mucosas humanas que, em condições normais, permanece inofensiva. No entanto, mediante ruptura da barreira cutânea ou estados de imunossupressão, pode atuar como patógeno oportunista, causando infecções cutâneas graves (TAYLOR & UNAKAL, 2019; O’GARA, 2017; TOUAITIA *et al.*, 2025). No ambiente hospitalar, *S. aureus* é reconhecido como um dos principais agentes de infecções associadas à assistência à saúde (ARAÚJO *et al.*, 2023).

Dentre suas variantes, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) se destaca devido à resistência conferida pelo gene *mecA*, que codifica a proteína PBP2a e inviabiliza a ação da maioria dos antibióticos β -lactâmicos (GUPTA *et al.*, 2023; HAMDY *et al.*, 2019). Além da resistência intrínseca, a capacidade de formar biofilmes em feridas constitui um fator crítico de virulência, dificultando tanto a penetração de antimicrobianos quanto a resposta imune do hospedeiro. Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, envoltas por uma matriz extracelular polimérica que favorece a persistência das infecções e contribui para a tolerância aumentada frente a diferentes agentes antimicrobianos e antissépticos (GUEDES *et al.*, 2024). Essa combinação de resistência genética e biofilme confere à MRSA um desafio clínico significativo, exigindo estratégias terapêuticas e de

controle mais eficazes. Devido à gravidade dessas infecções e à resistência antimicrobiana, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o MRSA como patógeno prioritário para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (WHO, 2024).

Nesse cenário, os sabonetes antissépticos assumem papel relevante como medida preventiva e de controle, especialmente em ambientes clínicos e hospitalares. Formulações contendo triclosan ou clorexidina têm demonstrado eficácia na redução da carga bacteriana planctônica e na interrupção da cadeia de transmissão (PARK *et al.*, 2022). Contudo, a eficácia desses antissépticos pode ser significativamente menor frente a biofilmes, uma vez que as bactérias protegidas por matriz extracelular apresentam maior tolerância a agentes antimicrobianos. Além disso, as evidências disponíveis permanecem limitadas, uma vez que a maioria dos estudos foi conduzida em modelos *in vitro* ou em organismos não mamíferos, não refletindo plenamente as condições fisiológicas de feridas humanas, onde biofilmes persistentes representam um desafio crítico para a desinfecção e cicatrização.

Diante disso, a utilização de modelos *ex vivo* de infecção cutânea em pele suína surge como uma alternativa promissora, considerando sua semelhança anatômica e funcional com a pele humana. Esses modelos possibilitam uma avaliação mais próxima da realidade clínica, permitindo o estudo das interações entre biofilme, tecido e antisséptico, bem como a testagem de produtos tópicos sem a necessidade imediata de ensaios *in vivo*. Apesar da ampla variedade de sabonetes antissépticos disponíveis, ainda são escassos os estudos que investigam sua ação contra biofilmes de MRSA em feridas. Nesse cenário, estudos que explorem a eficácia desses produtos em modelos *ex vivo* podem forne-

cer evidências mais consistentes para o desenvolvimento de medidas complementares de controle, fortalecendo as bases científicas para sua aplicação em contextos clínicos e hospitalares. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de sabonetes antissépticos comerciais na inibição e destruição de biofilmes de MRSA em modelo *ex vivo* de ferida em pele suína.

MÉTODO

Susceptibilidade antimicrobiana

Concentração inibitória mínima (CIM)

Para a realização deste estudo, foram selecionados os sabonetes líquidos das marcas Protex®, Nivea® e Rexona®, adquiridos em farmácias do município de Dourados-MS. A CIM desses sabonetes foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* M07-A9 (CLSI, 2012), com adaptações.

Os ensaios foram conduzidos utilizando uma cepa clínica de MRSA, isolada de ferida cirúrgica e com resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA* (MRSA 6). O isolado foi obtido da coleção do Grupo de Pesquisa em Ensaios Microbiológicos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), e seu perfil de resistência já havia sido previamente caracterizado. Para o preparo do inóculo, a MRSA foi suspensa em solução salina estéril (0,9%) e padronizado em espectrofotômetro à 625 nm para obter uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, os sabonetes líquidos foram submetidos a diluições seriadas (1:2) em microplacas de 96 poços com caldo Mueller-Hinton, com concentrações que variaram de 0,09% a 50%. Posteriormente, foram preparados controles negativos para avaliar a esterilidade do meio de cultura e dos sabonetes, bem como controles

positivos para verificar a viabilidade do microrganismo. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A leitura visual foi realizada com a adição de 50 µL da solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 0,1%, sendo a CIM determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, evidenciada pela ausência de coloração rosada.

Concentração bactericida mínima (CBM)

Após a interpretação da CIM, uma alíquota de 10 µL dos poços que não apresentaram crescimento visível foram transferidos para placas com ágar Mueller-Hinton, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h. A menor concentração em que não houve crescimento de unidade formadora de colônia foi determinada como CBM.

Ensaio de difusão em disco

A atividade antimicrobiana dos sabonetes comerciais Rexona®, Nivea® e Protex® também foi avaliada pelo método de difusão em disco em ágar, conforme descrito por Fernandes *et al.* (2023), com adaptações. A superfície do ágar foi inoculada com MRSA, utilizando *swabs* estéreis embebidos em suspensão bacteriana ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Discos de papel-filtro estéreis (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 20 µL do sabonete nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, sendo posteriormente aplicados diretamente sobre o ágar inoculado. As placas foram incubadas de forma invertida a 37 °C por 24 h.

Como controle negativo, foram utilizados discos contendo apenas o caldo Mueller-Hinton. Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição ao redor dos discos foram mensurados com régua milimetrada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a interpretação dos resultados foi feita segundo os critérios propostos por Alves *et al.* (2000): zonas

de inibição <9 mm indicam ausência de atividade antimicrobiana; entre 9 e 12mm, baixa atividade; entre 13 e 18 mm, atividade moderada; e >18 mm, alta atividade.

Atividade antibiofilme

Ensaio de inibição da formação de biofilme

A atividade antibiofilme foi avaliada com o sabonete que apresentou melhor atividade antimicrobiana. O efeito na inibição da formação de biofilme foi avaliado conforme descrito por Costa *et al.* (2014), com modificações. A cepa de MRSA foi cultivada em caldo *Tryptic Soy Broth* suplementado com 1% de glicose (TSBG), sob agitação a 80 rpm, a 37 °C, por 24 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 5000×g por 5 minutos, lavadas três vezes com solução tampão fosfato (PBS), ressuspensas em caldo TSBG e ajustadas para uma densidade óptica equivalente a 1×10^8 UFC/mL, medida a 625 nm.

Para o tratamento, foram utilizadas concentrações de 6,25%, 12,5% e 25% do sabonete. Em microplacas de 12 poços, juntamente com o inóculo, foram incubadas sob agitação (80 rpm), a 37 °C, por 24 horas. Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS para remoção das células não aderentes, e os biofilmes foram quantificados pelo método XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida dissódica) (PIERCE *et al.*, 2010). O percentual de inibição da formação do biofilme foi calculado utilizando a seguinte equação: % Inibição = (Absorbância do controle positivo – Absorbância da amostra) / Absorbância do controle positivo × 100.

Ensaio de destruição de biofilme pré-formados

Para avaliação da eficácia do sabonete sobre biofilmes pré-formados, MRSA foi inicialmente

te incubada em TSB com 1% de glicose em microplacas de 12 poços, sob agitação (80 rpm) a 37 °C por 24 horas, para promover a formação do biofilme. Em seguida os poços foram lavados com PBS para remoção das células não aderidas e tratados com o sabonete nas concentrações de 6,25%, 12,5% e 25%, e incubados novamente sob agitação a 80 rpm, a 37 °C, por mais 24 horas. Posteriormente, os biofilmes foram lavados com PBS e quantificados pelo método XTT (PIERCE *et al.*, 2010). O percentual de inibição da formação do biofilme foi calculado utilizando a seguinte equação: % Destruição = (Absorbância do controle positivo – Absorbância da amostra) / Absorbância do controle positivo × 100.

Ensaio de atividade antibiofilme em modelo *ex vivo* de ferida em pele suína

A capacidade do sabonete de inibir a formação de biofilme e destruir biofilmes maduros foi avaliada em modelo *ex vivo* de pele suína, conforme Horton *et al.* (2020), com modificações, utilizando inóculos preparados conforme descrito nos ensaios de biofilme *in vitro*. Amostras de pele suína, adquiridas em comércio local, foram cortadas com *punch* de biópsia (12 mm) e descontaminadas por 18 h em solução de estreptomicina (1000 µg/mL) e penicilina (1000 U/mL). Em seguida, as peles foram submetidas a 3 ciclos de banho ultrassônico (20 min/ciclo) em DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) para remoção de resíduos de antibióticos.

Após lavagem com DPBS, as biópsias foram transferidas para placas de 12 poços contendo DMEM semissólido suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para simular a barreira epidérmica, parafina derretida foi aplicada ao redor de cada biópsia na interface pele-meio, isolando os compartimentos e restringindo o crescimento de MRSA à derme do meio. Em seguida, 10 µL da suspensão bacteriana (1×10^8

UFC/mL) foram adicionados à epiderme, seguidos por 10 µL do sabonete nas concentrações de 25%, 12,5% ou 6,25%. As placas foram incubadas por 37 °C por 24 horas.

Após a incubação, as amostras de pele foram transferidas para tubos com 10 mL de NaCl, agitadas em vórtex por 10 min e submetidas a diluições seriadas para semeadura em ágar Manitol. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas após 24 h a 37 °C, e a porcentagem de inibição e destruição de biofilme maduro foi calculada pela fórmula: % inibição ou destruição = [(número de UFC/mL controle positivo) - (número de UFC/mL tratamento)] / (número de UFC/mL controle positivo) x 100. O ensaio foi realizado em triplicata e em momentos distintos.

Microscopia de fluorescência

A integridade da membrana celular nos biofilmes foi avaliada com o *Filmtracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit* da Invitrogen™, conforme instruções do fabricante. A cepa MRSA foi cultivada em *coverslips*, coradas com SYTO® 9, um corante fluorescente verde que penetra em todas as células e iodeto de propídio, um corante fluorescente vermelho que cora apenas células que sofreram alguma integridade na estrutura da membrana, incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência LED Leica DM-1000, filtros L5 ET com excitação 480/40 e emissão 527/30 e um filtro RHOD ET com excitação 546/10 e emissão 585/50 foi utilizado para avaliar as amostras. A captura das imagens foi realizada por meio do *software* LAS X.

Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio de ANOVA e post-hoc de Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando P

$<0,05$. As análises estatísticas e gráficas foram realizadas utilizando o GraphPad Prisma 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e ensaio de difusão em disco

A análise dos resultados evidencia diferenças marcantes na eficácia antimicrobiana entre os sabonetes testados frente ao *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA). O Rexona® apresentou maior consistência, com CIM de 3,12% e CBM entre 3,12-6,25%, enquanto Protex® e Nívea® exibiram variação significativa, alcançando valores de CIM de até 12,5% e 50%, respectivamente (**Tabela 6.1**). Esses dados indicam que apenas o Rexona® manteve estabilidade e desempenho superior ao longo dos diferentes momentos analisados. Como controle do teste, utilizou-se clorexidina, que apresentou CIM de 2,34 µg/mL e CBM de 4,68 µg/mL, confirmando a confiabilidade dos ensaios realizados.

Ao relacionar esses resultados com a formulação de cada produto, observa-se que o Rexona® contém timol e terpineol, compostos com ação antimicrobiana reconhecida, associados a uma base líquida de surfactantes aniônicos (como lauril éter sulfato de sódio), que favorecem a remoção mecânica e contato com o microrganismo. Essa composição pode explicar a consistência observada nos testes, ainda que a concentração efetiva dos ativos determine o grau de ação bactericida (YANG *et al.*, 2023; CRUZ *et al.*, 2022). Por outro lado, o Protex®, em suas versões atuais, contém extratos vegetais como óleo de melaleuca e chá verde, com efeito antimicrobiano leve e dependente de concentração, enquanto versões antigas com triclocarban, hoje

restritas por regulamentações (FDA, 2016) possuíam atividade mais robusta. A variabilidade nos resultados do Protex® pode refletir essa reformulação e a menor eficácia dos extratos frente a cepas resistentes.

O Nivea®, por sua vez, evidencia uma formulação voltada ao cuidado cosmético, com ênfase em agentes emolientes como lanolina e

pantenol, sem ingredientes antibacterianos comprovados. A ausência de compostos com ação específica contra microrganismos, aliada a uma matriz mais oleosa, pode limitar a penetração e interação com a parede celular bacteriana, justificando os altos valores de CIM e CBM.

Tabela 6.1 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos sabonetes líquidos antissépticos Rexona®, Protex® e Nivea®, frente *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em (%) e clorexidina µg/mL

Amostras	Momento 1		Momento 2		Momento 3	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Clorexidina	2,34	4,68	2,34	4,68	2,34	4,68
Rexona®	3,12	3,12	3,12	6,25	3,12	3,12
Protex®	3,12	12,5	0,39	3,12	12,5	12,5
Nivea®	6,25	25	50	50	3,12	25

Vale ressaltar que a determinação da CIM em sabonetes líquidos apresenta desafios específicos, devido à saponificação e à dificuldade de manter concentrações fixas durante as diluições, mesmo em microplacas de 96 poços. Para consolidar a robustez da pesquisa, a atividade antimicrobiana também foi avaliada pelo ensaio de difusão em disco, permitindo comparar os resultados obtidos em substratos líquidos e sólidos. Nesse ensaio, o sabonete Rexona® apresentou zonas de inibição variando de 14 mm a 10 mm nas concentrações de 6,25% a 100%, indicando que os ativos presentes mantêm efeito mesmo em diluições significativas. O Protex® exibiu halo de inibição apenas na concentração integral (100%), enquanto o Nivea® não apresentou atividade detectável (**Tabela 6.2**). Esses resultados corroboram os dados de CIM/CBM reforçando que o método de difusão em disco evidencia a capacidade do produto de exercer efeito antimicrobiano em substratos sólidos,

aproximando-se das condições práticas de aplicação na pele.

Atividade antibiofilme do sabonete antisséptico Rexona®

Dos três sabonetes comerciais avaliados (Rexona®, Protex® e Nivea®), o Rexona® apresentou a melhor atividade antibacteriana frente ao isolado clínico de MRSA. Dessa forma, os estudos de atividade antibiofilme foram conduzidos exclusivamente com o sabonete antisséptico Rexona®. Após os tratamentos, a atividade metabólica dos biofilmes foi mensurada pelo ensaio de XTT, um sal de tetrazólio reduzido por enzimas mitocondriais, que gera coloração alaranjada indicativa de viabilidade celular (ALONSO *et al.*, 2017). Os resultados demonstraram que todas as concentrações testadas reduziram significativamente a atividade metabólica do biofilme, tanto nos ensaios de inibição quanto nos de destruição (**Figura 6.1**).

Tabela 6.2 Teste difusão em disco dos sabonetes líquidos antissépticos Rexona®, Protex® e Nívea® frente *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Sabonetes	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
Rexona®	14 mm	12 mm	11 mm	10 mm	10 mm
Protex®	9 mm	-	-	-	-
Nívea®	-	-	-	-	-

Legenda: (-): Nenhuma atividade dentro das concentrações avaliadas de 6,25 a 100%.

É importante destacar que tratar biofilmes de MRSA provenientes de feridas cirúrgicas é particularmente desafiador devido à resistência intrínseca desse microrganismo. O isolado clínico utilizado neste estudo, MRSA 6, representa um modelo realista de infecção de pele, em que a resistência mediada pelo gene *mecA*, presente em elementos genéticos móveis *SCCmec*, confere proteção contra múltiplas classes de antimicrobianos, especialmente nos tipos I, II e III, típicos de isolados hospitalares (HAMADA *et al.*, 2021).

No ensaio de inibição da formação do biofilme, o sabonete Rexona® apresentou atividade expressiva contra o isolado clínico de MRSA, promovendo reduções significativas da atividade metabólica, especialmente nas concentrações de 12,5% e 25%, que resultaram em inibição próxima de 90%. Esses dados reforçam o potencial preventivo do sabonete contra a formação de biofilmes de MRSA, especialmente em ambientes clínicos e hospitalares.

Na avaliação da destruição de biofilmes maduros, o sabonete também apresentou eficácia marcante, reduzindo significativamente a viabilidade do biofilme em todas as concentrações testadas, com destaque para 25%, que alcançou mais de 80% de destruição. Considerando que biofilmes estabelecidos geralmente exigem concentrações de antimicrobianos 100 a 1000 vezes superiores às necessárias para células planctônicas (HUGHES & WEBBER, 2017), os resultados obtidos demonstram que o Rexona® foi capaz de reduzir de forma significativa

($P \leq 0,001$) a atividade metabólica do biofilme de MRSA utilizando apenas concentrações de até 25%, evidenciando seu potencial como agente antimicrobiano relevante para uso clínico. Esses achados são promissores, sugerindo que a aplicação tópica do sabonete antisséptico Rexona® pode constituir uma estratégia complementar na higienização e no controle de biofilmes em feridas superficiais, contribuindo para a redução da carga bacteriana e potencialmente auxiliando no processo de cicatrização.

Ensaio de atividade antibiofilme em modelo *ex vivo* de ferida em pele suína

A partir dos resultados promissores obtidos em ensaios *in vitro*, avaliando a atividade antimicrobiana contra MRSA, optou-se por investigar a eficácia antibiofilme do sabonete líquido Rexona® em um modelo *ex vivo* de pele suína, escolhido por sua alta similaridade estrutural e funcional com a pele humana. Os resultados demonstram que o sabonete apresentou atividade significativa tanto na inibição da formação de biofilme quanto na destruição de biofilmes pré-formados (**Figura 6.2**).

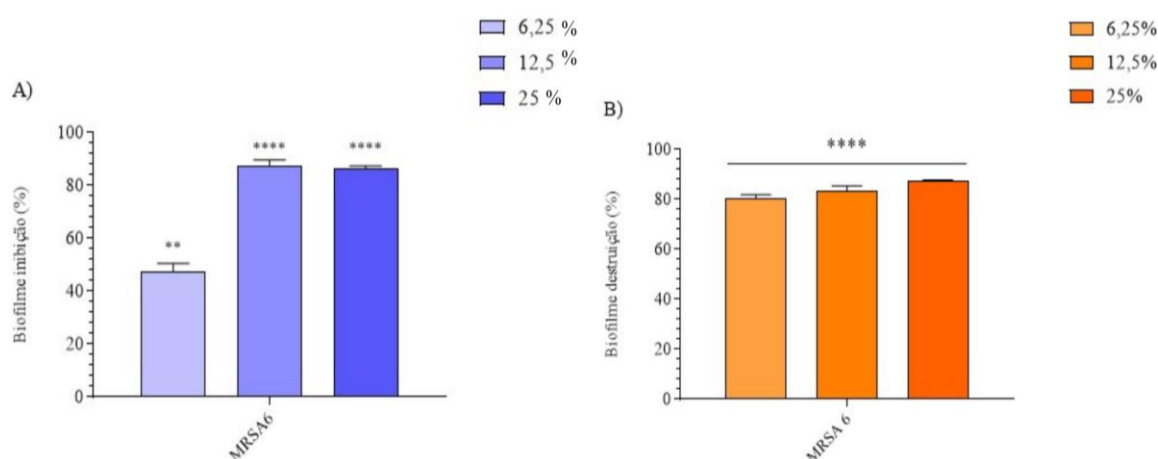
Na avaliação de inibição, a menor concentração testada (6,25%) já foi capaz de reduzir de forma expressiva a formação de biofilme, enquanto concentrações mais elevadas (12,5% e 25%) apresentaram valores próximos a 100%. No ensaio de destruição, a eficácia foi ainda mais evidente, uma vez que todas as concentrações testadas exibiram taxas superiores a 95%,

inclusive na menor concentração avaliada, demonstrando a elevada capacidade do sabonete em desestruturar biofilmes maduros.

Tais achados são particularmente relevantes, considerando que biofilmes estabelecidos representam um grande desafio clínico devido à sua maior tolerância a antimicrobianos conven-

cionais (FLEMMING *et al.*, 2021). O desempenho observado sugere que a formulação de sabonete, provavelmente associada à presença de surfactantes, fragrâncias e outros componentes antimicrobianos em sua composição, interfere na matriz extracelular e na adesão celular, culminando em um efeito de inibição e destruição do biofilme (JIMOH *et al.*, 2023).

Figura 6.1 Efeito do sabonete antisséptico Rexona® na inibição e destruição de biofilme de *Staphylococcus aureus* MRSA (isolado de ferida cirúrgica)



Legenda: (A) Porcentagem de inibição do biofilme após tratamento com sabonete Rexona® nas concentrações de 6,25%, 12,5% e 25%. Observa-se que o sabonete promoveu aumento significativo na inibição do biofilme, com maiores concentrações apresentando efeito mais pronunciado (**: $P \leq 0,01$; ****: $P \leq 0,0001$ em comparação ao controle, segundo ANOVA e teste post-hoc de Dunnett) e (B) Porcentagem de destruição do biofilme nas mesmas concentrações, indicando que no tratamento com sabonete Rexona® resultou em redução significativa da biomassa bacteriana, com maior efeito em concentrações mais altas (****: $P \leq 0,0001$ *versus* controle).

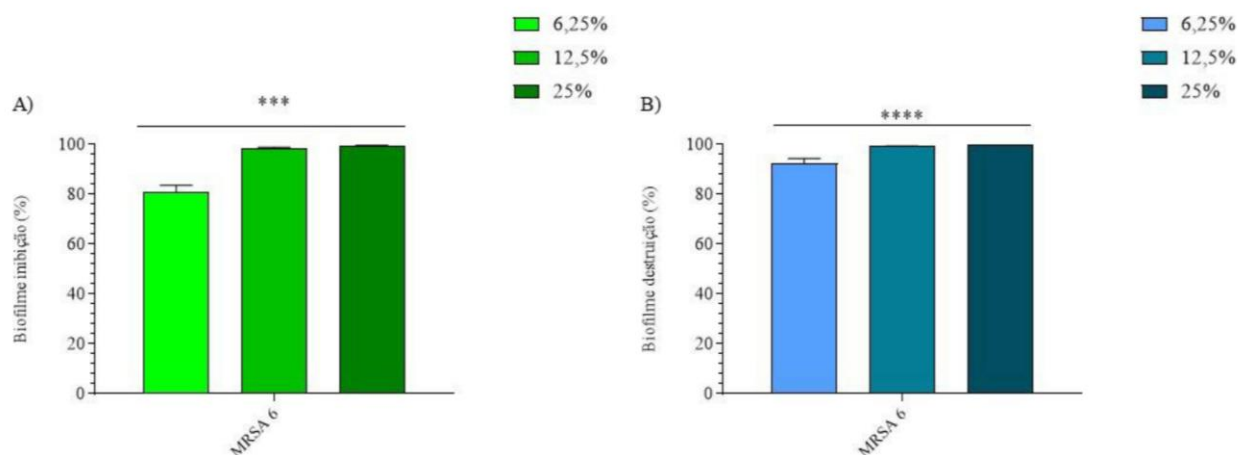
Estudos recentes corroboram esses achados, relatando que formulações cosméticas e de higiene pessoal contendo compostos ativos, agentes tensoativos e óleos essenciais podem apresentar efeito antibiofilme contra patógenos resistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* (ALVES *et al.*, 2021; SAHOO *et al.*, 2021). A atividade observada no presente estudo está em consonância com essas evidências e reforça a importância de avaliar o impacto de produtos de uso cotidiano na prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, tanto em ambientes comunitários quanto hospitalares.

Portanto, os resultados obtidos indicam que o sabonete líquido Rexona® não apenas inibe a formação, mas também promove a destruição de biofilmes maduros de MRSA, consolidando-se como um agente relevante na higienização da pele e potencial barreira na disseminação de patógenos multirresistentes.

Microscopia de fluorescência

Para caracterizar a influência do sabonete líquido Rexona® sobre a viabilidade celular do biofilme de MRSA, foi empregada a microscopia de fluorescência utilizando o kit *Live/Dead*.

Figura 6.2 Efeito do sabonete antisséptico Rexona® na inibição e destruição de biofilme de *Staphylococcus aureus* MRSA 6 (isolado de ferida cirúrgica) em modelo *ex vivo* de pele suína

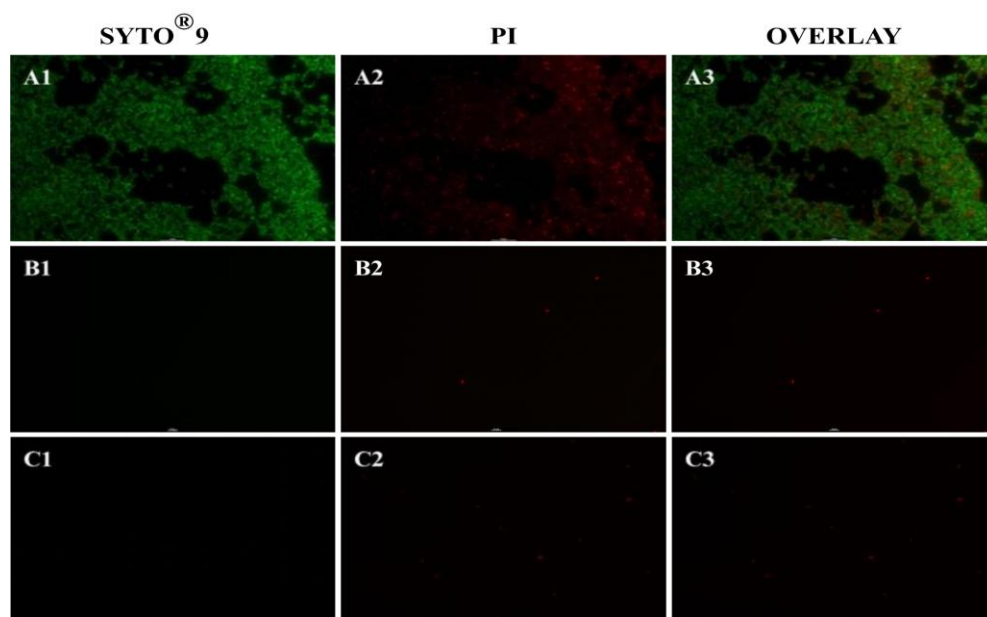


Legenda: (A) Porcentagem de inibição do biofilme após tratamento com Rexona® nas concentrações de 6,25%, 12,5% e 25%. Observa-se que o composto promoveu aumento significativo na inibição do biofilme, com maiores concentrações apresentando efeito mais pronunciado (***: $P \leq 0,001$ em comparação ao controle, segundo ANOVA e teste post-hoc de Dunnett) e (B) Porcentagem de destruição do biofilme nas mesmas concentrações, indicando que o tratamento com Rexona® resultou em redução significativa da biomassa bacteriana, com maior efeito em concentrações mais altas (****: $P \leq 0,0001$ *versus* controle).

Conforme demonstrado nas **Figuras 6.3 e 6.4**, as células tratadas com o sabonete apresentaram predominância de fluorescência vermelha, indicando perda da integridade da membra-

na bacteriana e aumento da permeabilidade celular.

Figura 6.3 Viabilidade celular de biofilmes de MRSA 6 (isolado clínico de ferida cirúrgica) por coloração *live/dead* e microscopia de fluorescência após tratamento com o sabonete Rexona® no ensaio de inibição da formação de biofilme



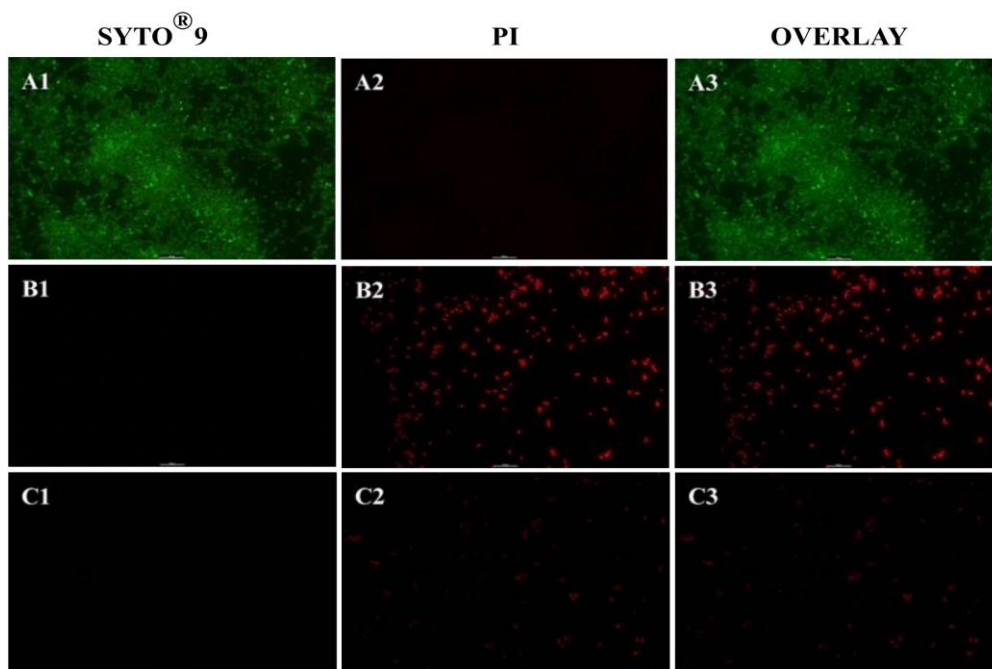
Nota: Células viáveis aparecem coradas em verde fluorescente e células mortas em vermelho fluorescente. **Legenda:** (A1, A2 e A3) Controles; (B1, B2 e B3) Tratados com 12,5% de Rexona®; (C1, C2 e C3) Tratados com 25% de Rexona®.

Em contrapartida, no controle não tratado, observou-se predominância de fluorescência verde, confirmando a presença de células viáveis com membranas preservadas. Esses achados demonstram que o tratamento compromete de forma significativa a integridade celular do biofilme. Os resultados sugerem que os componentes da formulação do sabonete Rexona®, como tensoativos aniônicos e agentes antimicrobianos, exercem ação direta sobre a membrana bacteriana, comprometendo sua estrutura e levando à inibição do crescimento e/ou morte celular. Estudos recentes corroboram esse mecanismo, demonstrando que surfactantes e substâncias bioativas presentes em produtos de higiene são capazes de induzir desorganização

da membrana plasmática, facilitando a penetração de compostos e provocando danos estruturais irreversíveis (SAHOO *et al.*, 2021).

Embora a penetração do iodeto de propídio seja frequentemente associada à morte celular, sua absorção está diretamente relacionada ao aumento da permeabilidade da membrana, podendo induzir estresse celular e comprometer a viabilidade bacteriana mesmo sem lise imediata (ROSENBERG *et al.*, 2019; FLEMMING *et al.*, 2021). Dessa forma, a ação observada reforça a eficácia do sabonete testado contra biofilmes de MRSA, apontando para seu potencial papel na redução da disseminação de microrganismos resistentes em superfícies cutâneas.

Figura 6.4 Viabilidade celular de biofilmes maduros de MRSA 6 (isolado clínico) por coloração *live/dead* e microscopia de fluorescência após tratamento com o sabonete Rexona® no ensaio de destruição do biofilme



Nota: Células viáveis aparecem coradas em verde fluorescente e células mortas em vermelho fluorescente. **Legenda:** (A1, A2 e A3) Controles; (B1, B2 e B3) Tratados com 12,5% de Rexona®; (C1, C2 e C3) Tratados com 25% de Rexona®.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que os sabonetes antissépticos avaliados apresentaram eficácia distinta frente ao *Staphylococcus*

aureus resistente à meticilina (MRSA), com destaque para o Rexona®, que exibiu maior consistência antimicrobiana. A avaliação de CIM/CBM revelou sua capacidade de inibir o

crescimento bacteriano em concentrações relativamente baixas, enquanto o ensaio de difusão em disco confirmou a atuação sobre substratos sólidos, simulando condições mais próximas da aplicação prática na pele. Nos ensaios de atividade antibiofilme, o sabonete líquido Rexona® demonstrou reduzir significativamente a formação de biofilmes e desestruturar biofilmes pré-formados. A microscopia de fluorescência corrobora esses resultados, evidenciando que o tratamento compromete a integridade da membrana celular bacteriana, aumenta a permeabilidade e diminui a viabilidade das células do biofilme, sugerindo um mecanismo de ação direto sobre a matriz e a adesão celular.

Por fim, a aplicação do sabonete em modelo *ex vivo* de pele suína, que reproduz de forma confiável características da pele humana, confirmou sua eficácia antibiofilme em um contexto mais próximo da realidade clínica. Os dados obtidos indicam que o uso tópico do Rexona® pode atuar como uma medida preventiva e auxiliar na higienização, contribuindo para a redução da carga bacteriana em feridas superficiais, potencialmente apoiando a cicatrização e reforçando seu papel como ferramenta prática na contenção de microrganismos multirresistentes em ambientes comunitários e hospitalares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, B. *et al.* Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, v. 139, p. 135, 2017. doi: 10.1016/j.mimet.2017.06.004.
- ALVES, P.M. *et al.* Antibiofilm activity of triclosan and essential oils in cosmetic formulations against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 131, 2021.
- ALVES, T.M.A. *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367, 2000. doi: 10.1590/S0074-02762000000300012.
- ARAÚJO, T.O. *et al.* Agentes patogênicos e fatores de risco para infecções relacionadas à assistência à saúde em ambiente hospitalar: revisão integrativa da literatura [trabalho de conclusão de curso]. Cuité: Universidade Federal de Campina Grande, 2023.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. M7-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 9. ed. Wayne: CLSI, 2012.
- COSTA, E.M. *et al.* A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 1081, 2014. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.041.
- CRUZ, J.N. *et al.* *In Silico* evaluation of the antimicrobial activity of thymol: major compounds in the essential oil of *Lippia thymoides* mart. & Schauer (Verbenaceae). *Molecules*, v. 27, p. 4768, 2022. doi: 10.3390/molecules27154768.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Safety and effectiveness of consumer antiseptics; topical antimicrobial drug products for over-the-counter human use. Washington: FDA, 2016.
- FERNANDES, L. *et al.* Effect of vapor-phase oregano essential oil on resistant *Candida* species biofilms: mechanisms of action. *Microbiology Spectrum*, v. 11, e0512422, 2023. doi: 10.1128/spectrum.05124-22.
- FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofilms for environmental protection and management. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, 2021.
- GUEDES, E.M. *et al.* Biofilm formation in *Staphylococcus aureus*: mechanisms, regulation, and clinical relevance. *Pathogens*, v. 13, p. 40, 2024.
- GUPTA, P. *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: genetics, mechanisms, and clinical challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1178456, 2023.
- HAMADA, Y. *et al.* Increased incidence and plasma-biofilm formation ability of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from patients with bacteremia. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 11, 2021. doi: 10.3389/jcimb.2021.602833.
- HAMDY, R.F. *et al.* β -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the role of PBP2a. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, e00020-19, 2019.
- HORTON, M.V. *et al.* *Candida auris* forms high-burden biofilms in skin niche conditions and on porcine skin. *mSphere*, v. 5, e00910, 2020. doi: 10.1128/mSphere.00910-19.
- HUGHES, G. & WEBBER, M.A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, p. 2237, 2017. doi: 10.1111/bph.13706.
- JIMOH, A.A. *et al.* Do biosurfactants as anti-biofilm agents have a future in clinical applications? *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2023. doi: 10.3389/fbioe.2023.1244595.
- O'GARA, J.P. Into the storm: chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonisation to life-threatening infections. *Environmental Microbiology*, v. 19, p. 3823, 2017. doi: 10.1111/1462-2920.13833.
- PARK, S.Y. *et al.* The effect of antimicrobial hand soaps on skin microbiota and infection prevention. *American Journal of Infection Control*, v. 50, p. 653, 2022.
- PIERCE, C.G. *et al.* A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Visualized Experiments*, n. 44, p. 2287, 2010. doi: 10.3791/2287.
- ROSENBERG, M. *et al.* Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports*, v. 9, p. 6483, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-42906-3.
- SAHOO, D. *et al.* Role of surfactants and emulsifiers in antibiofilm activity: implications for antimicrobial therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 204, p. 111819, 2021.
- STIEFEL, P. *et al.* Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*, v. 15, p. 36, 2015. doi: 10.1186/s12866-015-0376-x.

TAYLOR, T.A. & UNAKAL, C.G. *Staphylococcus aureus*. StatPearls, 2019.

TOUAITIA, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and management. Microbial Pathogenesis, v. 194, p. 106910, 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization, 2024.

YANG, X. *et al.* Antibacterial activity and mechanisms of α -terpineol against foodborne pathogenic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 107, p. 6641, 2023. doi: 10.1007/s00253-023-12737-4.