

## BIOFILMES BACTERIANOS E COVID-19: UM OLHAR INTEGRADO EM SAÚDE ÚNICA

**Bruno Felipe Alves Puliti<sup>1</sup>, Letícia de Souza<sup>1</sup>, Jorge Pamplona Pagnossa<sup>2</sup>,  
Lázaro Pinto Medeiros Neto<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Avenida Padre Clétus Francis Cox, 1661 - Jardim Country Club - 37714-620 - Poços de Caldas - MG, Brasil, [brunofelipepuliti@gmail.com](mailto:brunofelipepuliti@gmail.com), [leticia.souza.13925@gmail.com](mailto:leticia.souza.13925@gmail.com), [lpmn\\_777@yahoo.com.br](mailto:lpmn_777@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Universidade Estácio de Sá - UNESA, Departamento de Ciências Biológicas, Taguatinga Sul - Q CS CSG 9, Brasília, DF, Brasil, [jorge.pagnossa@professores.estacio.br](mailto:jorge.pagnossa@professores.estacio.br)

### Resumo

A formação de biofilmes é algo natural e que serve como um mecanismo de proteção para os microrganismos. Contudo, este mecanismo de proteção também pode interferir em outros aspectos como a resistência a antimicrobianos ou sanitizantes. Assim, este projeto tem como objetivo avaliar 38 cepas obtidas durante o período pandêmico (COVID19) em relação a capacidade de formação de biofilmes e sua adaptação a antibióticos. Para isso, será realizado as etapas: reativação das cepas bacterianas em ágar triptona de soja (TSA), análise da curva de crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus coagulase-negativo* em caldo triptona de soja (TSB) no espectrofotômetro, a avaliação da formação de biofilmes em microplacas de poliestireno e por último, sua adaptação a antibióticos. Até o momento, a reativação das cepas, primeira etapa, foi realizada demonstrando que todas as cepas estão viáveis e aptas para serem usadas nas outras etapas do estudo. Com a finalização do estudo, pretendemos discutir mais sobre a disseminação dos microrganismos por biofilmes e seus impactos na Saúde Única.

**Palavras-chave:** Biofilmes. Saúde Única. *Staphylococcus sp.* Microrganismos.

**Área do Conhecimento:** Biomedicina

### Introdução

O conceito de Saúde Única (*One Health*) é o conjunto de várias práticas que trabalham juntas local, nacional e globalmente para ajudar a alcançar padrões de saúde ideal para seres humanos, animais e meio ambiente. A tríade da saúde única mostra como a saúde das populações, dos animais e do meio ambiente estão ligados uns aos outros, sendo dependentes e correlacionadas entre si, ou seja, um impacto gerado em animais vai resultar em consequências ambientais e para a humanidade, bem como um impacto ambiental gera desastres no reino animal como um todo (Sinclair, 2019).

Em outro aspecto, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um tema de crescente importância nas ciências biomédicas. Os antibióticos são substâncias que exercem pressão de seleção sobre as bactérias, levando à ocorrência de bactérias resistentes. Assim, as bactérias adquirem resistência de diversas formas e utilizam diferentes mecanismos para contornar a ação das drogas antimicrobianas. Pelo fato de os antimicrobianos serem utilizados nos seres humanos, nos animais e na agricultura, é aconselhável a abordagem do tema sob uma perspectiva de Saúde Única (Limongi; Oliveira, 2020). Tal uso indiscriminado de antibióticos foi notado durante a pandemia de COVID-19, devido a falta de conhecimento, atenção e na tentativa de tratamentos eficazes, potencializando a resistência bacteriana (Silva *et al.*, 2024), inclusive sobre o gênero *Staphylococcus* (Ai *et al.*, 2024; Norberg *et al.*, 2022).

Além do uso indiscriminado de antibióticos, os biofilmes, comunidades microbianas organizadas compostas por agregados de células que excretam substâncias poliméricas, que por sua vez, podem formar camadas, também podem atuar na resistência bacteriana. Praticamente todos os microrganismos possuem potencial para formar biofilmes, desde que encontrem condições ambientais adequadas para seu desenvolvimento (Muhammad *et al.*, 2021). Uma vez estabelecido o biofilme, as células mostram-se mais protegidas contra agressões ambientais, fato que torna mais difícil sua eliminação, proporcionando também adaptação a diferentes fatores de estresse, dentre eles a exposição à sanitizantes e antibióticos (Uruen *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2021).

Neste aspecto, prevenção da instalação e eliminação das comunidades microbianas tem se tornado preocupação constante nos ambientes clínicos (Andersson *et al.*, 2020). Por conseguinte, a higienização ineficiente e a inadequada remoção dos microrganismos das superfícies e instalações que entram em contato com os produtos afetam diretamente sua qualidade com a possibilidade de contaminação do paciente. Sendo assim, as falhas na higienização das superfícies possibilitam a aderência dos resíduos orgânicos, formando o filme condicionante, tornando as mesmas como potenciais fontes de contaminações (Rutala; Weber, 2019). Desta forma, este trabalho visa contribuir para abrir novos caminhos para futuras pesquisas, considerando a capacidade de formação de biofilmes e a adaptação a doses subletais à antibióticos de cepas patogênicas de bactérias do gênero *Staphylococcus*, oriundas do período pandêmico da Covid-19, e observação dentro do escopo da abordagem em Saúde Única, culminando em próximas intervenções positivas para a comunidade local e progresso no conhecimento científico.

## Metodologia

O estudo, inicialmente aprovado pelo CEP da UNIFESP sob o número: 4.318.859, se desenvolverá no modelo investigativo-experimental e delineamento estratégico visando a correlação entre a formação e classificação de biofilmes de 38 isolados bacterianos oriundos de amostras clínicas em período pandêmico (Covid-19), do Hospital da Unimed de Lorena-SP, e a abordagem em Saúde Única correlacionada ao perigo do abuso de dosagens subletais de antibióticos da classe dos macrolídeos para uso em humanos. As amostras foram obtidas de diferentes sítios infecciosos de pacientes internados e, após os procedimentos de crescimento em placacom fins de diagnóstico, de acordo com os protocolos do hospital citado, foram separadas amostras para estudo, as quais foram congeladas em meio crioprotetor.

As culturas-estoque serão armazenadas em meio de congelamento (15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 100 mL de água destilada, pH 7,0). As culturas serão descongeladas à temperatura ambiente e reativadas inoculando-se alíquotas de 100 µL em tubos contendo 10 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37 °C/24h. A padronização dos inoculos será realizada mediante curva de crescimento de uma cepa padrão ATCC de *Staphylococcus sp.*, gentilmente cedida pela CCMA (Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Após a reativação, alíquotas de 50 µL dos inoculos serão transferidas para 300 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37 °C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de uma hora) em espectrofotômetro (densidade óptica de 600 nm) e plaqueamento em Ágar Triptona de Soja (TSA) com incubação a 37 °C/24h. Desta forma, as culturas serão padronizadas em 108 UFC mL<sup>-1</sup> para a construção da curva de crescimento e posterior comparação com a escala de 0,5 McFarland para utilização nos ensaios posteriores.

A concentração mínima bactericida dos antibióticos azitromicina, eritromicina e clindamicina frente aos 38 isolados clínicos de *Staphylococcus* será determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) com adaptações. Desta forma, serão obtidas soluções de TSB e de antibióticos nas concentrações de 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00% (v/v). Alíquotas 150 µL das soluções serão adicionadas nas cavidades e inoculados 10 µL da cultura padronizada. As microplacas serão incubadas a 37 °C/24h. Após esse período, será realizado o plaqueamento de alíquotas de três alíquotas de 10 µL das culturas de cada poço em TSA utilizando a técnica de microgotas; por fim, as placas serão incubadas a 37 °C/24h. Após incubação, será determinada a concentração mínima bactericida dos antibióticos, como sendo sua menor concentração capaz de promover a ausência de crescimento dos isolados de *Staphylococcus* em placa. O experimento será realizado em triplicata e três repetições utilizando dois controles para cada antibiótico testado; sendo um controle negativo, contendo 150 µL de TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (v/v) e antibiótico e um controle positivo, contendo 150 µL TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (v/v) e 10 µL de inóculo padronizado.

Ademais, células de isolados de *Staphylococcus* serão cultivadas a fim de quantificar e classificar a capacidade de formação de biofilmes por medidas indiretas de densidade óptica a 620 nm. Alíquotas de 50 µL das culturas serão inoculadas nas cavidades das microplacas de forma padronizada em 150 µL de TSB seguida de incubação a 37 °C/48h. Após esse período as culturas serão removidas e as cavidades serão, por sua vez, lavadas três vezes com solução de 0,85% de NaCl (m/v) para remoção

das células não aderidas. Para o controle negativo serão adicionados nas cavidades 200  $\mu$ L de TSB sem adição de inóculo. Posteriormente, 200  $\mu$ L de solução de cristal violeta 0,1% (m/v) serão adicionados nas cavidades. Após 10 minutos de exposição a solução será retirada e as cavidades serão lavadas três vezes com solução NaCl 0,85% (m/v). As microplacas serão secas em temperatura ambiente, e os biofilmes formados desprendidos pela adição de 200  $\mu$ L de etanol 95% (v/v). Os conteúdos das cavidades serão homogeneizados e transferidos para nova microplaca. A concentração de cristal violeta será avaliada pela medição de absorbância a 600 nm em leitor de microplaca de poliestireno de 96 poços (Tecan Infinite m200 pro) (Merritt; Kadouri; O'toole, 2011).

Para a determinação da capacidade de formação de biofilme, será utilizada a seguinte classificação: Não formadora de biofilme ( $Doa \leq Do_{cn}$ ), fracamente formadora de biofilme ( $Do_{cn} < Doa \leq 2 \times Do_{cn}$ ), moderadamente formadora de biofilme ( $2 \times Do_{cn} < Doa \leq 4 \times Do_{cn}$ ) e fortemente formadora de biofilme ( $4 \times Do_{cn} < Doa$ ). Onde Doa é a densidade óptica do biofilme e Do<sub>cn</sub> a densidade óptica do controle de crescimento negativo (Stepanović *et al.*, 2000). Os valores finais serão obtidos pelas médias aritméticas das absorbâncias lidas, sendo realizadas 8 replicatas.

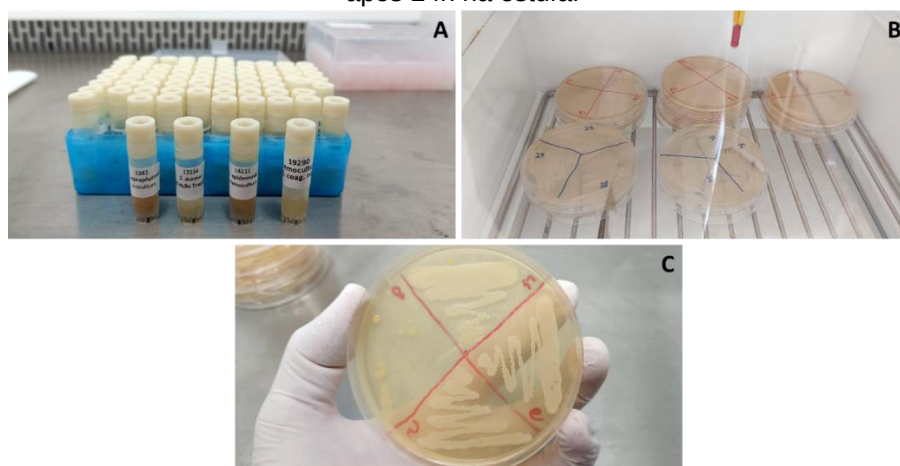
Finalmente, para a análise da adaptação dos biofilmes bacterianos, os isolados bacterianos serão expostos por 12h a concentrações subletais dos antibióticos ( $\frac{1}{4}$  da concentração mínima bactericida obtida nos testes anteriores), homogeneizados em TSB. Após incubação as culturas serão removidas e as cavidades lavadas com solução salina por três vezes. Desta forma, os biofilmes adaptados serão desafiados às mesmas concentrações dos antibióticos previamente testados. Aliquotas de 200  $\mu$ L de soluções aquosas de antibióticos nas mesmas concentrações serão adicionadas nas cavidades e após 20 minutos de contato, as soluções serão removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v). Em seguida, 200  $\mu$ L de TSB serão adicionados às cavidades e as microplacas serão incubadas a 37 °C/24h. Após esse período, será realizado o plaqueamento de alíquotas de 10  $\mu$ L das culturas tratadas em TSA pela técnica de microgotas seguido de incubação a 37 °C/24h e, assim, determinada a concentração dos antibióticos capazes de eliminar biofilmes de *Staphylococcus* que sofreram adaptação em estado sésil.

## Resultados

O atual estudo tem como principais etapas metodológicas a reativação das cepas obtidas, seguido da realização de uma curva de crescimento para as espécies presentes e por último, pela avaliação da formação de biofilmes e análise de sua adaptação frente a doses subletais de antibióticos.

Considerando que o presente estudo está em andamento, inicialmente, foi realizada a reativação das cepas utilizando ágar triptona de soja (TSA), seguindo todos os procedimentos de Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Após 24h foi possível evidenciar que as bactérias estavam viáveis, uma vez que foi possível notar o crescimento pra cada cepa (Figura 1).

Figura 1 - Processo de ativação das cepas adquiridas durante a pandemia de COVID19. A: Cepas adquiridas durante o período pandêmico; B: Placas na estufa para crescimento bacteriano; C: Placas após 24h na estufa.



Fonte: o autor (2025)

Após observarmos a viabilidade das cepas bacterianas, a próxima etapa será gerar as curvas de crescimento para as diferentes espécies de bactérias avaliadas, ou seja, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus coagulase-negativo*, de forma a entender o perfil de crescimento para cada. Posteriormente à aquisição das curvas de crescimento, os procedimentos para a avaliação do crescimento de biofilmes e a análise da adaptação de tais biofilmes a doses subletais para antibióticos serão realizados, de acordo com a metodologia proposta.

## Discussão

A contribuição do projeto está fundamentada na investigação da proliferação microbiana inadequada na forma de biofilmes, podendo atingir diversos ambientes: desde clínico-hospitalares até comunitários urbanos, agropecuários e fontes hídricas. Isto poderá contribuir positivamente à comunidade acadêmica como uma nova fonte de informação sobre as bactérias oriundas de um cenário pandêmico, além de averiguar a relação entre a tríade da abordagem em Saúde Única, tornando-se imprescindível a atuação parceira de profissionais de múltiplas áreas para que as informações corretas sejam disseminadas.

O presente projeto também apresenta impactos sociais, abordando três dos dezessete Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas – as ODS da ONU, com foco na ODS 3, saúde e bem-estar; ODS 4, educação de qualidade; e a ODS 14: vida na água. Neste campo, esse projeto ainda pode auxiliar em ações que visam prolongar a incidência de novas emergências de contaminações e infecções microbiológicas, promovendo o sistema único de saúde.

Desta forma, o cultivo laboratorial por meio de curva de crescimento, quantificação e classificação de biofilmes, bem como testes de adaptação a doses subletais de antimicrobianos da classe dos macrolídeos, mostram-se necessários para evidenciar a correlação existente entre a formação de biofilmes ambientais e o uso indiscriminado de tais antibióticos, visto que estão dentro do conceito holístico em Saúde Única.

## Conclusão

O entendimento sobre a capacidade de formação de biofilmes pelos microrganismos é importante, uma vez que estes biofilmes podem interferir de forma direta na saúde da população, na saúde animal e no meio ambiente (Saúde Única). Ao percebermos que as características dos biofilmes podem potencializar a resistência bacteriana, compreender o padrão de formação de biofilmes e a adaptação a doses subletais de cepas do gênero *Staphylococcus* obtidas de amostras clínicas, de diferentes sítios infecciosos, durante a pandemia Covid-19 reforçará a necessidade de trabalharmos na teoria do uso racional de medicamentos, principalmente quando discutimos sobre antimicrobianos.

Portanto, os resultados deste estudo, ainda em desenvolvimento, irão contribuir para que este tema seja melhor discutido, servindo de base científica. Ademais, esperamos poder avançar na temática em próximos estudos, avaliando a adaptação dos biofilmes, bem como seu padrão de crescimento em diferentes tipos de microplásticos e bioplásticos.

## Referências

- Ai, L., *et al.* The impact of the COVID-19 pandemic on *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients admitted with community acquired pneumonia. **Sci. Rep.**, v. 14, p. 15737, 2024.
- Andersson, D.I., *et al.* Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 44, n. 2, p. 171-188, 2020.
- Limongi, J.E.; de Oliveira, S.V. COVID-19 e a abordagem One Health (Saúde Única): uma revisão sistemática. **Vigil. Sanit. Debate**, v. 8, n. 3, 139-149, 2020.
- Merritt, J.H.; Kadouri, D.E.; O'toole, G.A. Growing and Analyzing Static Biofilms. **Curr. Protoc. Microbiol.**, s. 22, unit. 1 B.1, 2011.

Muhammad, M.H., *et al.* Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. **Front. Microbiol.**, v. 11, p. 928, 2020.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, Wayne, Pa, USA, 2003.

Norberg, A.N., *et al.* Infecções por *Staphylococcus* spp. concorrentes à COVID-19: uma revisão de literature. **Res., Soc. Dev.**, v. 11, n. 9, p. e58611932460, 2022.

Rutala, W.A.; Weber, D.J. Best practices for disinfection of noncritical environmental surfaces and equipment in health care facilities: A bundle approach. **Am. J. Infect. Control.**, v. 47, p. A96-A105, 2019.

Silva, L.G., *et al.* Uso indiscriminado de antimicrobianos no contexto da Covid-19: aumento da resistência bacteriana. **REAS**, v. 24, n. 5, p. e15880, 2024.

Sinclair, J.R. Importance of a One Health approach in advancing global health security and the Sustainable Development Goals. **Rev Sci Tech.**, v. 38, n. 1, p. 145–154, 2019.

Stepanović, S., *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

Uruén, C., *et al.* Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 3, 2020.

Wong, G.C., *et al.* Roadmap on emerging concepts in the physical biology of bacterial biofilms: from surface sensing to community formation. **Phys. Biol.**, v. 18, n. 5, p. 051501, 2021.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) – PIBIC-FAPEMIG - 2025/33058. Bolsistas: Letícia Souza e Bruno Felipe Alves Puliti. Os autores também agradecem a Pontifícia Universidade Católica - campus Poços de Caldas pelo suporte.