

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO *IN VITRO* DE UMA FORMULAÇÃO
TERAPÊUTICA CONTENDO NISINA PARATRATAMENTO
ALTERNATIVO DA MASTITE BOVINA**

**LAURA ANTONIA CAMILOTTI¹, CRISTIAN FERREIRA CORONA², EDINEIA
PAULA SARTORI SCHMITZ³, DALILA MOTER BENVENÚ⁴, FABIANA ELIAS⁵**

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A mastite bovina é uma enfermidade caracterizada pela inflamação das glândulas mamárias causada principalmente por bactérias e fungos que possui alta prevalência nos rebanhos leiteiros (PERES NETO; ZAPPA, 2011). A ampla acessibilidade do produtor aos antimicrobianos convencionais associada à escolha errônea desses antibióticos, esquemas de tratamento contribuem para o desenvolvimento da resistência a princípios ativos comumente utilizados (LOPES; LACERDA; RONDA, 2013; PETERS; SILVEIRA; FISCHER, 2015).

Alternativamente aos antibióticos convencionais, substâncias presentes naturalmente no leite podem apresentar atividade antimicrobiana promissora. O uso destes compostos naturais, como é o caso da nisina, torna-se relevante no tratamento de doenças infecciosas, além da redução do custo com medicamentos, constituindo-se como método natural de redução de carga bacteriana, diminuindo os gastos na produção leiteira (CEOTTO-VIGODER et al, 2016).

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é desenvolver uma formulação terapêutica contendo nisina e realizar testes *in vitro* sobre agentes infecciosos isolados de bovinos acometidos por mastite.

1 Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, laurinhacamilotti@gmail.com

2 Acadêmico do Curso de Nutrição, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, cristianferreiracorona@gmail.com

3 Doutora, Mestre, Química, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza

4 Professora, Doutora, Farmacêutica, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza

5 Professora, Doutora, Médica Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, orientadora

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - Campus Realeza. As análises microbiológicas e o preparo das formulações terapêuticas ocorreram no laboratório de microbiologia e nos laboratórios de Química da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Campus Realeza-PR, respectivamente.

Para a formulação foi produzido um gel usando como agente espessante a Goma Xantana, e como agente antimicrobiano a Nisina. O processo iniciou com a produção de um gel base contendo 0,3% de goma xantana dissolvida em 50 mL de água ultrapura estéril, pH 3,0, que foi levado para agitação magnética até tornar-se homogêneo. Após repouso, dois tipos de formulações foram obtidas. As formulações com as siglas V, continham o gel base e solução estoque de nisina previamente preparada. Já as formulações com as siglas G, continham a nisina que havia sido preparada na hora e o gel base. A mistura do gel com a solução estoque de nisina foi levada para agitação no vórtex até que se atingisse a consistência desejada, com subsequente refrigeração (2-8 °C), permanecendo até o momento do teste de suas características e propriedades antimicrobianas. O gel base produzido contendo 0,3% de goma xantana apresentou-se com aparência translúcida esbranquiçada e leve odor característico do agente gelificante.

Para a preparação da solução estoque, o pó de nisina foi dissolvido em um balão volumétrico de 50 mL contendo 10 mL de HCl 0,00794 mol/L. Posteriormente, foi avaliado o pH da solução. O gel base usado, foi preparado na concentração de 0,3% de Goma Xantana e 50 mL de água ultrapura, pH 3,0. Assim, a formulação V1 e G1 continha 5000 µL de goma xantana na concentração de 0,3% e 82 µL de nisina, tendo 656 UI como concentração final. Já a formulação V2 e G2, foram produzidos com 4877 µL do gel base de goma xantana e solução estoque de nisina na concentração de 123 µL. Para obtenção destes valores, foram realizados cálculos a partir da concentração de nisina, que equivale a 40000 UI e por meio dos valores obtidos pela CIM e CBM. Para o cálculo final, utilizou-se 984 µL, já que esta concentração representa 50% a mais que a maior concentração

inibitória mínima (CIM), que foi de 656 UI, obtendo-se 123 μL de nisina para perfazer os 5000 μL de gel a 984 UI.

Para o teste antimicrobiano por difusão em poço de Ágar, foi usado um produto comercial indicado para o tratamento de mastite bovina de aplicação intramamária com a concentração de 2,5 % de Gentamicina como princípio ativo, sendo este, considerado como controle positivo. Foram testados então, o gel base (GB) isoladamente, sem a presença de nisina; a formulação que continha a xantana a 0,3% e a nisina que já havia sido previamente preparada, em concentrações a 656 UI (V1) e a 984 UI (V2); a formulação que continha xantana a 0,3% e nisina a 656 UI (G2) e 984 UI (G1), no entanto, esta nisina teve seu preparo 24 horas antes do teste de atividade antimicrobiana e água destilada, sendo essa última o controle negativo. Cada poço recebeu cerca de 50 μL de cada substância a ser testada. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nisina apresentou atividade bacteriostática e bactericida relevantes, de forma efetiva contra 27 cepas de *S. aureus* testadas. A CIM média da nisina foi de 238 $\mu\text{g/mL}$. O valor máximo foi de 250 $\mu\text{g/mL}$ e o mínimo de 156,25 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto isso, a CBM do presente trabalho teve um valor médio de 455 $\mu\text{g/mL}$, sendo o valor máximo de 625 $\mu\text{g/mL}$ e o mínimo de 250 $\mu\text{g/mL}$. Assim, de acordo com nossos dados, vários estudos já confirmaram a atividade bactericida de formulações contendo nisina (ALVES, 2018; SZWEDA et al., 2014).

Como está demonstrado na Tabela 1, a grande maioria dos géis produzidos não apresentaram atividade antimicrobiana, exceção se faz ao hidrogel que continha a xantana a 0,3% e a nisina a 984UI que havia sido preparada 24 antes do teste, pois este apresentou um considerável halo de inibição. Além de que, pelo fato de uma formulação que havia sido preparada 24 horas antes do teste ter apresentado um significativo halo de inibição, confirma que o tempo percorrido entre o preparo e a utilização não interferiu no resultado, ou até mesmo foi capaz de gerar um resultado. A técnica de difusão em poço se mostrou

eficiente levando em consideração os resultados obtidos pela Gentamicina. Porém, a ausência de efeito microbiano pode ser devido à falta de difusão dos géis no meio. Em testes realizados onde se objetivava analisar a atividade da nisina contra biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina, verificou-se um significativo efeito bactericida. Além disso, estudos que avaliaram o sinergismo da nisina associada a uma classe de antibióticos, resultaram em uma redução sinérgica do crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, sugerindo que a nisina associada a outras classes de antibióticos ou bacteriocinas pode ser utilizada para o tratamento da mastite bovina (CEOTTO-VIGODER et al, 2016 ; KITAZAKI, 2017).

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de formulações de gel contendo diferente concentrações de nisina e goma xantana contra cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina.

Poço	Produto teste	Halo de inibição (mm)			
		Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
1	Gentamicina 2,5%	26,88	23,87	23,60	23,00
2	Gel V1	-	-	-	-
3	Gel V2	-	-	-	-
4	Gel GB	-	-	-	-
5	Gel G1	-	-	-	-
6	Gel G2	-	11,54	-	-
7	Água destilada	-	-	-	-

Nº 1: Gentamicina a 2,5% Nº 2: xantana 0,3% e nisina a 656 UI Nº 3: xantana 0,3% e nisina a 984 UI Nº 4: xantana a 0,3% e 50 mL de água ultrapura Nº 5: xantana a 0,3% e nisina a 656 UI Nº 6: xantana a 0,3% e nisina a 984 UI Nº 7: água destilada estéril.

5 CONCLUSÃO

A nisina apresenta potencial atividade antimicrobiana, podendo ser utilizada como uma opção alternativa para tratamento de mastite bovina. No entanto, apesar do hidrogel apresentar-se versátil e estável, nos testes realizados e com os resultados obtidos, visualizou-se que ele não foi capaz de manter a capacidade antimicrobiana como

demonstrado nos testes de CIM e CBM ou ainda, há a possibilidade de que, nos meios em que ele foi produzido, não tenha ocorrido a liberação do princípio ativo nisina. Desta forma, recomenda-se a realização de novos testes, empregando diferentes agentes para formulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, Fernanda Cristina Bergamo. Mecanismos de ação da atividade antibacteriana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*. 2018.
- CEOTTO-VIGODER, H. et al. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 1, p. 101-114, 2016.
- KITAZAKI, Kohei et al. In vitro synergistic activities of cefazolin and nisin A against mastitis pathogens. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 17-0180, 2017.
- LOPES, L. O.; LACERDA, M. S. D.; RONDA, J. B. Uso de antibióticos na cura e controle de mastite clínica e subclínica causada por principais microrganismos contagiosos em bovinos leiteiros: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 11, n. 21, 2013.
- PERES NETO, Floriano; ZAPPA, Vanessa. Mastite Em Vacas Leiteiras- Revisão De Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 16, n. 1, p.128, jan. 2011
- PETERS, M. D. P.; SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V. Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. **Animal**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.2024-2028, 29 jul. 2015.
- SZWEDA, Piotr et al. Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 370-381, 2014.

Palavras-chave: Nisina; Glândula mamária; lactação; mastite bovina.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES – 2020-0344.

Financiamento: CNPq.