

**COMPOSTOS TRIAZÓLICOS: ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA.**

**GABRIEL ROHLING^{1,2*}, EDUARDA SOCOVOSKI GNOATTO^{2,3}, ANDRÉ
LAZARIN GALLINA^{2,4}, DALILA MOTER BENVENÚ⁵, LETIÈRE CABREIRA
SOARES^{2,6}**

1 Introdução

A pecuária de leite é uma importante atividade econômica, tendo grande atribuição a geração de empregos e renda para a população. Um dos maiores desafios desta atividade é o controle da mastite, uma inflamação ou infecção da glândula mamária (SANTOS, 2016).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva, com cepas que colonizam o interior da glândula mamária, canal e a pele que reveste o teto. No interior desses órgãos ela se fixa às células e promove infecção, produção de toxinas e necrose tecidual, o que interfere na secreção da glândula mamária, diminuindo a produção do leite (NETO e ZAPPA, 2011).

O uso desordenado de antibióticos em rebanhos leiteiros resultou no aumento da resistência bacteriana. Quando falamos em *S. aureus*, seus traços de resistência são bastante variáveis entre rebanhos e este fato pode estar relacionado à capacidade de aquisição de resistência que este microrganismo possui (COSTA *et al.*, 2013).

Diante do exposto, pesquisas têm buscado alternativas para tratamento desta doença. Neste contexto, compostos triazólicos e seus derivados surgem como possíveis candidatos no combate deste microrganismo, considerando que estes compostos apresentam atividades biológicas como antibacteriana (HUSSAIN *et al.*, 2019).

Neste trabalho avaliamos a utilização dos triazóis A, B e C, conforme a figura 1, como agentes antibacterianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

1Discente do Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: rohling22@gmail.com

2 Grupo de Pesquisa em Energias Renováveis e Sustentabilidade

3 Discente do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

4 Doutor da Universidade do Centro Oeste, *campus* Cedeteg.

5 Doutora da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

6 Doutor da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, **Orientador.**

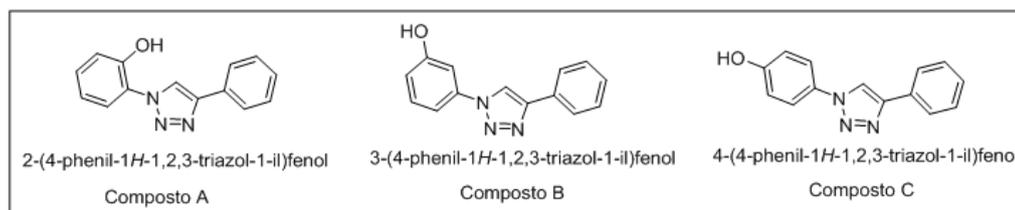


Figura 1. Moléculas de Triazol avaliadas no estudo.

2 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade e o efeito antimicrobiano de compostos triazólicos A, B e C sobre 6 cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

3 Metodologia

A pesquisa foi realizada na Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS/*Campus-Realeza*, cadastrada na plataforma eletrônica SisGen sob o nº A66F9EC. Os compostos triazólicos A, B e C foram sintetizados e caracterizados pelos pesquisadores do Grupo de Pesquisa em Energias Renováveis e Sustentabilidade (GPERS).

Para a atividade antimicrobiana 6 cepas de *Staphylococcus aureus* identificadas e isoladas de casos de mastite bovina, foram doadas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB- 13 USP).

As diferentes cepas bacterianas foram inoculadas em meio de enriquecimento *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram diluídas em solução salina 0,9%, posteriormente lidas em espectrofotômetro e padronizadas com absorbâncias entre 0,08 - 0,13 Ångstrom a um comprimento de onda de 625 nm.

Na sequência, a atividade antimicrobiana dos 3 compostos triazólicos foi avaliada pelo método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM foi realizada conforme a metodologia descrita no documento *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS* (2003). Distribuiu-se 100 µL Caldo *Mueller Hinton* (MH) em poços de uma placa de microdiluição de 96 poços, bem como 10 µL do inóculo padronizado. Em seguida, 115 µL da solução 0,0264 g/mL do triazol de interesse diluída em uma solução de água e acetona (1:3) foi adicionada nos poços da primeira linha da microplaca. O conteúdo foi homogeneizado e metade do volume foi transferida para os poços

da segunda linha, e assim, sucessivamente. A microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas. Após, realizou-se a leitura em 605 nm no equipamento Elisa Multiskan FC.

Com a definição da CIM, o conteúdo proveniente de um poço mais concentrado e dois poços menos concentrados, além do poço da CIM, foram semeados em placas de ágar Mueller-Hinton estéril e incubados a 37 °C por 24 horas. A Concentração Bactericida Mínima (CBM), foi a concentração de composto triazólico que impediu o surgimento de toda e qualquer colônia bacteriana. Porém, a CBM foi realizada apenas para o composto Triazólico A, pois foi o único que apresentou CIM.

Para a avaliação da toxicidade, 100 µL de uma suspensão de eritrócitos e 900 µL da solução de cada composto triazólico (379,50 µg/mL) foram homogeneizados, juntamente com o controle positivo (CP) contendo água destilada, o controle negativo (CN) contendo NaCl 0,9% e o branco da amostra (B). As amostras permaneceram em repouso, à 37 °C, por 1h e posteriormente foram centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm e coletou-se o sobrenadante. O grau de hemólise foi avaliado, qualitativamente, tanto pela tonalidade avermelhada (Hemólise) do sobrenadante, lido em espectrofotômetro a 540 nm (BRASIL, 2010), quanto pelo tamanho do botão de hemácias formado. O resultado foi expresso levando-se em conta o percentual de hemólise total dos compostos triazólicos que foi descrito mediante comparação com a hemólise do controle positivo e do controle negativo (ZHANG *et al*, 2019).

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Office Excel®. Para comparação das médias aritméticas, empregaram-se a análise de Variância de uma via (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey. Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4 Resultados e Discussão

Quando se testou a atividade antimicrobiana do composto A, o mesmo apresentou CIM de 189,75 µg/mL para as seis cepas de *S. aureus* estudadas, e CBM para as cepas: *S. aureus* 608 Sp (189,75 µg/mL), *S. aureus* 695 EE (759,00 µg/mL), *S. aureus* 569 ATNS (379,50 µg/mL). Os compostos B e C não apresentaram CIM e CBM.

Em um estudo realizado por Negi *et al.* (2016), verificou-se a atividade antimicrobiana de 35 compostos híbridos de metronidazol-triazol contra 30 cepas de *S. aureus*, resistentes à meticilina (MRSA). Todos os compostos testados foram ativos contra alguma cepa de *S. aureus* na concentração de 64 µg/mL. Dez compostos foram ativos a 8 µg/mL, desses dez

compostos cinco foram ativos a 4 µg/mL contra as cepas. Portanto, os resultados obtidos na presente pesquisa se diferem do encontrado pelos autores citados acima, pois as CIM dos compostos estudados nesta pesquisa foram superiores ao encontrado por esses autores.

Contudo, em um estudo realizado por Montes-Ávila *et al.* (2016), os pesquisadores avaliaram a atividade antibacteriana de 16 compostos derivados de 1-benzil-1,2,3-triazol, contra 9 patógenos bacterianos humanos: duas cepas: *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922 e sete isolados clínicos: *Streptococcus* grupo A-4, *S. aureus* 3, *E. coli* AO11, *E. coli* AO19, *E. coli* AO55, *Salmonella enterica* serovar Typhi e *Shigella dysenteriae*. Desses dezesseis compostos, um composto apresentou CIM de 50 µg/mL - 400 µg/mL contra *E. coli* AO11, *E. coli* AO15 e *S. enterica* serovar Typhi, e um outro composto apresentou CIM de 50 µg/mL - 400 µg/mL contra *S. aureus* 3, enquanto outros quatorze compostos foram inativos contra as mesmas bactérias. Todos os compostos testados foram inativos contra *Streptococcus* A-4, *E. coli* AO19, *Shigella dysenteriae*, *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922. Diante disso, a CIM encontrada frente a *S. aureus* 3, foi semelhante à obtida neste presente estudo.

Foi realizado o teste de toxicidade para os três compostos triazólicos. Quando o composto A, foi submetido ao teste de ensaio de hemólise *in vitro*, seu percentual de hemólise foi de $4,22 \pm 0,12$, estatisticamente superior aos valores obtidos para os compostos B com percentual de $3,18 \pm 0,11$ e composto C com percentual de $3,41 \pm 0,18$ ($p < 0,05$). De acordo com Zhang *et al.* (2019), pode-se afirmar esses compostos não são tóxicos.

Em um estudo realizado por Montes-Ávila *et al.* (2016), verificou-se a toxicidade de 16 compostos derivados de 1-benzil-1,2,3-triazol, pelo bioensaio de letalidade do microcrustáceo *Artemia salina*. Em geral, 11 dos 16 compostos não foram tóxicos com doses letais medianas (DL_{50}) > 1000 µg/mL, enquanto os outros 5 compostos foram moderadamente tóxicos $DL_{50} < 1000$ µg/mL. As DL_{50} , são as doses dos compostos capazes de causar a morte de 50 % do microcrustáceo estudado. Diante do que foi obtido neste presente estudo, e do que foi encontrado pelos autores, os compostos derivados de 1,2,3 triazol não apresentam alta toxicidade, podendo ser candidatos a outros ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

5 Conclusão

Por meio deste estudo, foi possível observar o potencial antimicrobiano do composto

A frente às bactérias testadas, além de observar a ausência de toxicidade dos três compostos triazólicos estudados. Com base neste trabalho, estudos futuros poderão ser desenvolvidos *in vivo* para avaliar a eficiência do composto A frente a bactérias causadoras da mastite.

Referências Bibliográficas

BRASIL. Farmacopeia Brasileira volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**. pp. 546, 2010.

COSTA, G. M *et al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v. 80, n. 3, pp. 297-302, 2013.

HUSSAIN, M., *et al.* Synthesis, antibacterial activity and molecular docking study of vanillin derived 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles as inhibitors of bacterial DNA synthesis. *Heliyon*, v. 5, Issue 11, 2019.

MONTES-ÁVILA, J *et al.* Antioxidant activity and antimicrobial evaluation of 1-benzyl-1,2,3-triazole. *Acta Universitaria*, v. 26, n. 3, pp. 63-67, 2016.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. *Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio*. Norma aprovada. Brasília: ANVISA; 2003.

NEGI, B *et al.* Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity, synergism with oxacillin and molecular docking studies of metronidazole-triazole hybrids, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 115, pp. 426-437, 2016.

NETO, F. P., ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 16, pp. 1679-7353, 2011.

SANTOS, I. P. dos. **Mastite Bovina: Diagnóstico e Prevenção**. Monografia (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos – PB. 2016.

ZHANG, K *et al.* Enantiomeric glycosylated cationic block co-betapeptides eradicate *Staphylococcus aureus* biofilms and antibiotic-tolerant persisters. *Nature Communications*. v.10. 4792. 2019.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Mastite bovina; 1,2,3-triazol;

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2021-0168

Financiamento: Fundação Araucária.