

## **AValiação BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATAS PRODUZIDAS A PARTIR DE EXTRATOS DE PINHÃO EM MICRORGANISMO CAUSADORES DE MASTITE BOVINA.**

**JULIANA ROZENDO BARBOSA<sup>1,2</sup>, IZADORA FERNANDA GOMES PRATES<sup>3,2</sup>, DALILA MOTER BENVEN<sup>4</sup>, FERNANDA OLIVEIRA LIMA<sup>5</sup>, LETIÉRE CABREIRA SOARES<sup>2,6</sup>**

### **1 Introdução**

Apontada como uma das doenças que mais afeta a bovinocultura leiteira do Brasil, a mastite bovina manifesta-se nas glândulas mamárias causando inflamações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, além de alterações patológicas no tecido glandular do bovino (MASSOTE *et al.*, 2019).

A mastite é classificada em duas categorias: ambiental, proveniente de condições higiênico-sanitárias; contagiosa, caracterizada pela presença de agentes inflamatórios como a bactéria Gram-positiva, em especial, *Staphylococcus aureus* (MASSOTE *et al.*, 2019).

Posto isto, um ramo da ciência que está em expansão são as nanopartículas de prata que se destacam pela sua ação na prevenção de colonização de bactérias e para o tratamento de infecções, sendo eficiente contra diferentes microrganismos como bactérias gram negativas e gram positivas (SILVA, 2021).

### **2 Objetivos Geral**

Avaliar as nanopartículas de prata, produzidas com extratos de pinhão, frente aos microrganismos causadores de mastite bovina.

### **3 Metodologia**

Os microrganismos utilizados no estudo foram 6 cepas de *S. aureus* identificadas e

1Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Realeza, Contato: Juliana.Barbosa@estudante.uffs.edu.br

2Grupo de Pesquisa em Energias Renováveis e Sustentabilidade

3Discente do curso de Biologia da Universidade Federal do Paraná *Campus* Centro politécnico, contato: izadorafgprates@gmail.com

4Doutora em Farmacologia, UFFS

5Doutora em Química Analítica, UFFS

6Doutor em Química Orgânica, UFFS, **Orientador.**

isoladas de casos de mastite doadas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB- 13 USP).

A partir do inóculo mãe, uma alçada de 0,01 ml foi adicionada a um tubo contendo 5 mL de caldo BHI (do inglês, Brain Heart Infusion) estéril, o qual foi incubado a 37 °C por 24 horas. Após, 400 µL de cada bactéria foram adicionadas aos poucos a tubos de 10 mL contendo 0,9 % de salina estéril. O caldo BHI estéril, sem inóculo, foi adicionado a um tubo contendo 10 mL de salina para comparação visual e espectrofotométrica. As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis e, para as amostras serem consideradas padronizadas, as respectivas absorvâncias devem estar na faixa de 0,08 – 0,13 Å a um comprimento de onda de 625 nm (CLSI, 2015).

Para a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a técnica empregada foi a microdiluição em microplacas. Cada uma das NP de Ag produzidas foram adicionadas na primeira linha da microplaca (A), que foi então homogeneizada e teve metade da solução diluída no poço seguinte. Na última linha da microplaca, foram adicionados os controles: negativo (somente caldo BHI), positivo (caldo BHI e inóculo) e controle das NP de Ag (caldo BHI e NP de Ag). Após, foram adicionados 10 µL de inóculo padronizado a cada um dos poços da microplaca. A microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas. Em seguida, a microplaca foi submetida à leitura em 605 nm no equipamento Elisa Multiskan FC. A CIM foi interpretada como o poço de menor concentração da solução de NP de Ag capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para a confirmação da CIM, foi acrescentado 15 µL do revelador resazurina, aos poços da microplaca e incubada por 24 horas contendo a microdiluição da NP de Ag e incubada a 37 °C durante 1 hora.

Com a determinação da CIM, o material proveniente de um poço mais concentrado e dois poços menos concentrados, 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 mínima da NP de Ag capaz de promover ação bactericida, ou seja, impedir o surgimento de toda e qualquer colônia bacteriana.

Os extratos foram preparados a partir de 8,750 g de casca de pinhão trituradas. As extrações foram realizadas utilizando os solventes água, etanol e água: etanol 50% (v/v). As cascas foram adicionadas em um béquer, 100 mL do solvente foi vertido sobre as cascas, 2 mL

de uma solução de NaOH 1 M foi adicionada e a mistura foi aquecida a 40 °C variando o tempo em 15 e 30 minutos. Após as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e filtradas, metodologia adaptada de (ROTA, 2018).

Para a síntese das nanopartículas de prata, foi adicionado em um tubo de ensaio, 1.000 µL de uma solução de AgNO<sub>3</sub> (0,001 M) e o pH da solução foi ajustado para 8,0, utilizando uma solução de NaOH (0,5 M). Em seguida, o extrato de interesse (1.000 µL) foi adicionado, a solução foi agitada. Após foram iniciados os testes microbiológicos (Metodologia adaptada de RAOTA, 2018).

#### 4 Resultados e Discussão

De acordo com Casanova (2010), o valor ideal para o potencial zeta de nanopartículas é de maior ou igual a +/- 30 mV, pois aumenta a estabilidade da suspensão devido a uma repulsão eletrostática. Foram assim analisados o potencial zeta de cada nanopartículas de prata nas soluções, Tabela 1.

Figura 1: Potencial zeta das NP de Ag.

Potencial zeta das nanopartículas de prata			
Tempo de aquecimento 40° C	Soluções		
	NP de Ag - Etanol	NP de Ag - H <sub>2</sub> O	NP de Ag – H <sub>2</sub> O:Etanol
30 minutos	-21,8 mV	-27,5 mV	-20,4 mV
15 minutos	-17,9 mV	-22,5 mV	-13 mV

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Ao estudar a ação antimicrobiana, frente a microrganismos causadores da mastite bovina *S. aureus*, das nanopartículas de prata com diferentes soluções sendo estas, etanol; água e água: etanol 50 % (v/v), foi possível observar que a CIM e a CBM, diante da *S. aureus*, mostraram um índice inferior de ação em comparação com o extrato puro (sem a nanoformulação).

Deste modo, foram então realizados os testes de CIM e CBM para as soluções com a nanoformulação e com o extrato, na concentração de 50 % e reduzindo assim a metade nos demais poços da microplaca (Tabela 2).

Figura 2: Resultados de CIM e CBM.

**Resultados de CIM e CBM**

	Soluções															
	NP de Ag - Etanol				Extrato - Etanol				NP de Ag - H <sub>2</sub> O:Etanol				Extrato - H <sub>2</sub> O:Etanol			
	30		15		30		15		30		15		30		15	
Tempo extração (min)																
Cepas <i>S. aureus</i>	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)
487 sp	50	X	X		12,5	X	25	X	50	50	X	25	25	X		
569 sp	50	X	X		12,5	X	6,25	X	50	50	X	25	25	X		
608 sp	50	X	X		12,5	X	12,5	X	25	25	X	12,5	12,5	X		
695 sp	50	X	X		12,5	50	12,5	X	50	50	X	25	25	X		
649 sp	50	X	X		12,5	X	12,5	X	50	50	X	50	50	X		
994 sp	50	X	X		12,5	50	12,5	X	25	25	X	25	25	X		

Fonte: Elaborados pelos autores (2023).

Nos testes de CIM e de CBM a 50 % com extração de 15 e de 30 min a 40 °C na solução de extrato do pinhão com água e com a NP de Ag não foi possível visualizar ação inibitória e bactericida, por isso, não foram incluídos na Tabela 2.

No estudo realizado por Fonseca *et. al*(2022), que avaliaram a concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento bacteriano por meio da associação de nanopartículas de prata em solução de quitosana, as nanopartículas de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) foram associadas a uma solução de quitosana (2%), os resultados sugerem um poder bactericida sobre as bactérias *Escherichia coli* e *S. aureus*, o que demonstra uma ação inibitória.

Observa-se que as nanopartículas de prata estudadas obtiveram melhores resultados na solução de água: etanol (v/v) com CIM e CBM a 25% para as cepas 608 e 994, visto que as nanoformulações têm características e atividades antimicrobianas, os resultados apresentaram um índice inferior ao esperado quando comparado com o extrato.

## 5 Conclusão

Através desta pesquisa, tornou-se viável detectar o potencial antimicrobiano das soluções, analisando a CIM e a CBM. Além disso, avaliar as nanopartículas de pratas no processo inibitório e bactericida frente a *S. aureus* de mastite bovina. Deste modo, os resultados se mostraram inferiores visto que as nanoformulações apresentaram um índice abaixo do

esperado de inibição em comparação com as soluções de extrato puro.

### Referências Bibliográficas

CASANOVA, Monise Cristina Ribeiro. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

FONSECA, Guilherme Aparecido Monteiro Duque et al. Potencial inibitório de nanopartículas de prata e quitosana no crescimento bacteriano. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 171-182, 2022.

MASSOTE, Vitória Pereira et al. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas-ISSN: 2674-9661**, v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019.

RAOTA, Camila Suliani. Síntese verde de nanopartículas de prata a partir do extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar Ives), **caracterização e aplicação na desinfecção de efluentes industriais**. 2018.

SILVA, Isadora Lícia Inácio et al. Nanopartículas de prata em bases de próteses de PMMA para controle de atividade microbiana. **Arquivos em Odontologia**, v. 57, p. 236-243, 2021.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de prata; Mastite; Extrato de pinhão.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2022-0222

**Financiamento:** Fundação Araucária.