

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA A PARTIR DE COMPOSTOS TRIAZÓLICOS SOBRE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

LARISSA SILVA ANDRADE^{1,2*}, EDUARDA SOCOVOSKI GNOATTO³, DALILA MOTER BENVENÚ⁴, FERNANDA OLIVEIRA DE LIMA⁵, LETIÉRE CABREIRA SOARES^{2,6}

1 Introdução

A mastite é uma das doenças mais comuns nos rebanhos leiteiros, a qual se caracteriza como uma inflamação ou infecção da glândula mamária, que pode prejudicar a qualidade e a quantidade de leite produzido (SANTOS, 2016). Esta enfermidade é causada principalmente por bactérias, que se manifestam devido às más condições higiênico-sanitárias do ambiente, estado de saúde debilitado dos animais e os cuidados inadequados com utensílios e equipamentos utilizados na ordenha (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

A utilização indiscriminada de antibióticos em rebanhos leiteiros tem aumentado, resultando na resistência microbiana a antibióticos, logo, atrapalhando o tratamento dessa doença (ALVEZ *et al.*, 2020; CADES, 2017). Ao falarmos em *Staphylococcus aureus*, seus traços de resistência são múltiplos entre rebanhos e tal fato relaciona-se à capacidade de aquisição de resistência que este microrganismo possui. Este é um dos patógenos mais importantes causadores da mastite, possuindo impacto econômico considerável (COSTA *et al.*, 2013).

Com o aumento constante da resistência microbiana a antibióticos, pesquisas buscam alternativas para tratamentos da mastite bovina que não acarretem mais resistência bacteriana (SILVA, 2012). À vista disso, os compostos triazólicos e seus derivados se apresentam como promissores, considerando que estes compostos apresentam atividades biológicas diversas

¹ Acadêmica do Curso de Bacharelado em Nutrição, da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: larissa.andrade@estudante.uffs.edu.br

² Grupo de Pesquisa BioSaúde Humana & Animal

³ Licenciada em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

⁴ Doutora da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

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

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

como: antiviral, antibacteriana e antifúngica (HUSSAIN *et al.*, 2019).

Logo, o maior desafio da pecuária leiteira, é o controle da qualidade microbiológica do seu produto.

2 Objetivos

Avaliar a toxicidade e o efeito antimicrobiano de compostos triazólicos sobre cepas de *S. aureus* isolados de mastite bovina, *in vitro*.

3 Metodologia

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, *Campus Realeza*. As análises microbiológicas ocorreram no laboratório de microbiologia da UFFS e foram empregados 3 (três) compostos triazólicos (Figura 1), sintetizados no projeto de pesquisa desenvolvido no âmbito do EDITAL N° 270/GR/UFFS/2020 (Síntese de derivados 2, 3 e 4- (1*H*-1,2,3-triazol-1-il) fenóis e aplicação como antioxidante para o biodiesel).

Os microrganismos utilizados no estudo foram 6 cepas de *S. aureus* identificadas e isoladas de casos de mastite doadas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As cepas foram inoculadas individualmente em microtubos contendo 800 µL de Caldo *Müller-Hinton* (CMH) acrescido de 20% de glicerina estéril e mantidos em ultrafreezer, a uma temperatura de - 80 °C (inóculo mãe). Posteriormente, inoculadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) estéril, incubado a 37 °C por 24 horas. Em seguida, diluídas em salina estéril, 0,9% NaCl, e após isso, lidas em espectrofotômetro e padronizadas com absorbâncias entre 0,08 - 0,13 a um comprimento de onda de 625 nm.

Para a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos 3 compostos triazólicos, foi usado a microdiluição em microplacas, adicionado aos poços de uma microplaca de 96 poços e adicionado 10 µL de inóculos padronizados. Após, para a confirmação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi acrescentado 15 µL do revelador Resazurina aos poços da microplaca. A CIM foi realizada conforme método descrito pelo *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, ao ser o único que apresentou CIM.

Para analisar a 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 ficaram em repouso, à 37 °C, por 1 h e foram posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm e coletou-se o sobrenadante. O grau de hemólise foi avaliado, qualitativamente, observando a tonalidade avermelhada (Hemólise) do sobrenadante, lido em espectrofotômetro a 540 nm (BRASIL, 2010), e pelo tamanho do botão de hemácias formado. Levou-se em conta o percentual de hemólise total dos compostos triazólicos descrito mediante comparação com a hemólise do controle positivo e do negativo (ZHANG *et al*, 2019).

Os dados foram tabulados no programa Excel e inicialmente realizada a análise descritiva para cálculo de média e desvio padrão. Posteriormente os dados foram avaliados por meio do teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. Foi adotado um valor de $p < 0,05$ como nível de significância.

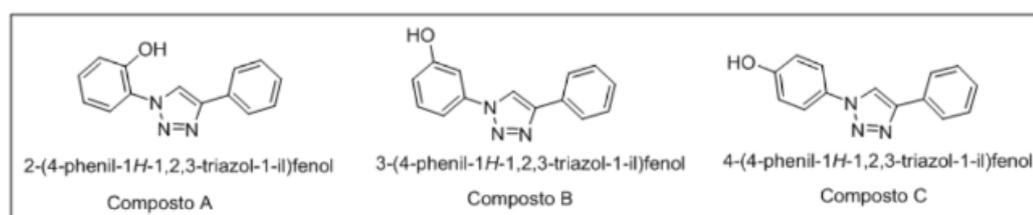


Figura 1. Triazóis estudados

4 Resultados e Discussão

Ao testar 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 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima, conforme as concentrações testadas.

Já com relação à toxicidade, foi realizado o teste de toxicidade para os três compostos triazólicos. Ao submeter o composto A, ao teste de ensaio de hemólise *in vitro*, foi de 4,22 % ± 0,12 %, estatisticamente superior aos valores dos compostos B de 3,18 % ± 0,11 % e composto C de 3,41 % ± 0,18 % (p<0,05). Conforme Zhang *et al.* (2019), é possível afirmar que esses compostos não são tóxicos.

Como os compostos 1,2,3-triazólicos não apresentaram toxicidade no teste de hemólise e apresentam efeito antimicrobiano significativo, são candidatos viáveis para serem utilizados em testes e ensaios *in vitro* e *in vivo* contra casos de mastite bovina.

5 Conclusão

Através deste estudo, observou-se potencial antimicrobiano do composto A frente às bactérias testadas. Ademais, observou-se a ausência de toxicidade dos três compostos triazólicos trabalhados no estudo.

Referências Bibliográficas

- ALVEZ, B. F. C. *et al.* Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina: Revisão. **PUBVET**. v.14, n° a557, 2020.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**. pp. 546, 2010.
- CADES, M. *et al.* Perfil de resistência antimicrobiana de mastite bovina em propriedade leiteira no município de Monte Negro/RO. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v. 6, n. 1, p. 15-20, 2017.
- COSTA, G. M. *et al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, 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, n° e02812, 2019.

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.

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.

SIMÕES, T. V. M. D. OLIVEIRA, A. A. de. **Mastite bovina, considerações e impactos econômicos** – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 25 p.

SILVA, I. F. da. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de novos compostos triazólicos**. 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

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: 1,2,3-triazol; Toxicidade; Rebanhos leiteiros.

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

Financiamento: Fundação Araucária.