



IX IFCULTURA

NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNP) CONTRA *Staphylococcus aureus* CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

Tiago da Silva Tibolla (tiagotibolla@gmail.com)
Gabriela Cristina Zucchi da Rosa (gabrielazdarosa@gmail.com)
Camila Andreis Marcon (camila.marcon20@gmail.com)
Gustavo Daniel Riffel König (gustavo.konig012@gmail.com)
Leandro Lunardi (leandro.lunardi@ifc.edu.br)
Barbara Priscila Pereira da Silva (barbarapriscila_silva@hotmail.com)
Alessandra Farias Millezi (alessandra.millezi@ifc.edu.br)

RESUMO

A mastite bovina, é a doença com maior frequência no rebanho leiteiro, e a que acarreta mais prejuízos. O uso generalizado de antibióticos de amplo espectro para tratamento desta enfermidade, resultou no desenvolvimento de resistência por numerosos patógenos bacterianos. Desta forma, busca-se o desenvolvimento de métodos alternativos, tais como as nanopartículas de prata (AgNPs), que vêm se destacando pela sua ação bactericida e por não causar efeito tóxico no tecido mamário. Dentre os principais microrganismos causadores de mastite, está *Staphylococcus aureus*. O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência da nanopartícula de prata contra *S. aureus*. A partir da solução matriz de nanopartícula preparada de 4mg/ml, foram feitas diluições em 7 diferentes concentrações: 0,1; 0,5; 1,2; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/L, a fim de obter a Concentração Inibitória Mínima (CMI), assim como inibição das células planctônicas. Como resultados obtidos, pela análise de disco difusão, os tratamentos não foram significativos. Entretanto, pela análise de CMI/CMB, não houve células bacterianas viáveis nas contagens de unidade formadora de colônias (UFC), demonstrando a ação antibacteriana frente a células planctônicas. Portanto, conclui-se que as nanopartículas de prata apresentaram ação antibacteriana para o controle da bactéria *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Ação antibacteriana; bactéria patogênica; controle alternativo.

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença com maior prevalência, e a que mais acarreta prejuízos na cadeia leiteira. As consequências dessa patologia são alterações nas propriedades físico-químicas do leite e no parênquima glandular (SILVA; RUEGG, 2017). Existem duas formas de apresentação, quando as alterações são visíveis macroscopicamente, denomina-se mastite clínica, e quando as alterações não são visíveis a olho nu, temos a mastite subclínica (PRESTES, 2003).

Dentre os microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças

veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e elevada contagiosidade (ZECCONI E HAHN, 2000). Para o tratamento dos casos clínicos e subclínicos, usa-se uma vasta gama de antimicrobianos com amplo espectro, que por sua vez, na maioria dos casos são usados de forma inadequada, ocasionando em agentes resistentes devido a pressão de seleção. Essa resistência a múltiplas drogas antimicrobianas é um problema crescente, selecionando microrganismos resistentes e causando perdas econômicas na produção leiteira (YUAH et al, 2017).

Nesta premissa, há necessidade de utilizar meios alternativos, econômicos e eficientes que diminuam o uso dos medicamentos tradicionais. Uma alternativa recente e promissora é o uso de compostos nano estruturados, estes medicamentos podem ser administrados por várias vias, com aumento da seletividade pelo local de ação. A nanotecnologia está cada vez mais ganhando seu espaço, devido à sua capacidade de modular os metais em seu tamanho nanométrico, mudando as propriedades químicas, físicas e ópticas, além de possuir grande potencial bactericida e inibitório, e de retardar o crescimento de fungos (NECULAI-VALEANU, 2021).

Diante do exposto, este trabalho buscou avaliar o efeito *in vitro* da prata nanoparticulada sob *S. aureus*, principal agente causador da mastite.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 LOCAL DE TRABALHO E CEPA BACTERIANA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia do Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia. Foi utilizada a seguinte cepa bacteriana referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.2 PREPARO DA SOLUÇÃO MATRIZ DE NANOPARTÍCULA DE PRATA

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biologia do IFC – Campus Santa Rosa do Sul. Foi preparado um concentrado de prata (solução matriz), o que consiste em dissolver 10 g de gelatina incolor, usada como estabilizante em 300 ml de água destilada, aquecendo até 40°C. Sob agitação constante, foi acrescentado 6,3 g de nitrato de prata, dissolvido em 200 ml de água destilada. Para a redução dessa suspensão, foi utilizada 50 g de dextrose em 500 ml de água destilada, sob agitação, foi acrescentada a suspensão de nitrato de prata com gelatina, e em frasco de âmbar e levado ao forno por 2 dias a 70°C. Com concentração de 4 mg/ml.

Após decorrido o tempo, o pH foi corrigido para 7,0, utilizando bicarbonato de sódio a 10%, a solução retorna para o forno por mais 6 h. Esse processo foi repetido até estabilizar o pH. Foram testadas 7 diferentes concentrações de nanopartículas de prata, 0,1; 0,5; 1,2; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/l. Onde cada uma foi denominada respectivamente como: T, U, V, W, X, Y e Z. As concentrações foram preparadas por diluição da solução matriz em água destilada utilizando a seguinte fórmula: Volume de concentração: (concentração desejada X volume desejado) /solução matriz)).

2.4 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

Para determinação do perfil de sensibilidade das bactérias, foram realizados os testes por disco-difusão em Ágar Mueller Hinton (Merck, Alemanha). Foram utilizadas as 7 concentrações e para o controle positivo foi utilizado Cloranfenicol. As cepas foram ativadas em Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubadas a a 37°C/18-24 h. Após, foram selecionadas de 3 a 5 colônias de cada placa para a padronização em solução salina (NaCl) estéril 0,9% (m/v) pela escala de 0,5 de Mc-Farland. Posteriormente, as cepas foram semeadas com suabe estéril em Ágar Mueller Hinton, em placas de Petri de 150mmx25mm, em todos os sentidos e direções a fim de assegurar a distribuição uniforme dos inóculos. Após a adição dos discos, as placas

foram invertidas e incubadas a 37°C/18-24h. Os resultados foram mensurados por meio da medição dos diâmetros (mm) das zonas de completa inibição do crescimento por meio de paquímetro digital. Os valores de halos inibitórios obtidos foram comparados com aqueles de referência do Clinical and Laboratory Standards Methods Institute (CLSI, 2018), os quais determinam o perfil de susceptibilidade do microrganismo em **resistente, intermediário e sensível**. Havendo inibição bacteriana, proceder-se-á aos testes de quantificação de células planctônicas. As análises foram feitas em triplicata com 3 repetições.

2.4 TESTE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA E BACTERICIDA (CMI / CMB)

Para determinar a CMI e CMB, foi seguida a metodologia de microdiluição em caldo de acordo com CLSI (2003). Foram utilizadas microplacas estéreis, com 96 poços e fundo chato. Na primeira coluna de poços, foram adicionados 100 µL das concentrações. Nas demais colunas, foram adicionados 100 µL de meio de cultura BHI em todos os poços, exceto nas colunas 9 e 11. Foram realizadas as diluições da linha, até a coluna 7, transferindo 100µL do primeiro poço para o segundo poço, desprezando-se os últimos 100 µL. Foram obtidas as concentrações: 500 µL/mL = 50%; 250 µL/mL = 25%; 125 µL/mL = 12,5%; 62,5 µL/mL = 6,25%; 31,25 µL/mL = 3,125%; 15,625 µL/mL = 1,56%; 7,8125 µL/mL = 0,78%; 3,90625 µL/mL = 0,39%. Seguindo a mesma denominação alfabética. A coluna 10 foi o controle positivo, em que foi adicionado apenas o inóculo bacteriano e a coluna 12 foi o controle negativo, adicionando-se somente meio de cultura BHI estéril. Assim, foram adicionados 10 µL de inóculo (10⁸ UFC/mL) exceto nas colunas 9, 11 e 12. A placa foi vedada com filme 3M (próprio para laboratório), para evitar a desidratação do meio. As microplacas foram incubadas a 37° por 24-48 h. Após, foram adicionados, em cada poço, 20 µL da solução de resazurina, procedendo-se à incubação por 1-2 h ou até o período suficiente de completa viragem da coloração, servindo como uma análise colorimétrica, onde a coloração rosa indica a atividade metabólica da bactéria, e a coloração azul a não atividade. Para a leitura dos resultados, a menor concentração onde houve alteração de coloração (de púrpura a rosa) representou a CIM. Para a CMB, foi realizado o plaqueamento dos poços em que não houve crescimento (coloração azul), inoculando-se em uma placa de TSA 10 µL. As placas foram identificadas e incubadas por 24 h/36°C, após foi feita a leitura dos resultados e foi considerada a CMB a concentração em que não houve crescimento bacteriano. Os testes foram feitos em triplicata e com três repetições.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

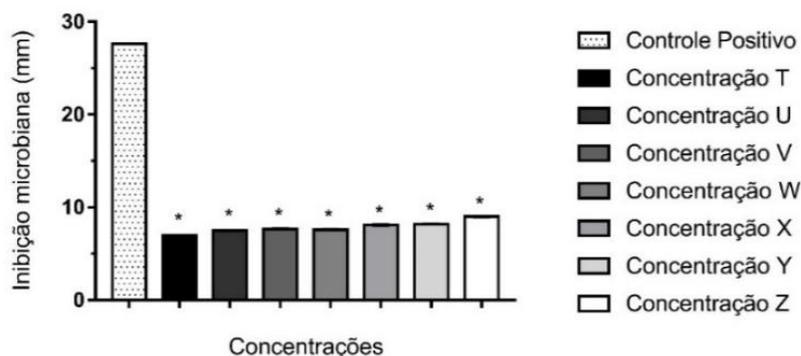
O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições em triplicatas. Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA seguido do teste de Dunnet a 95% de significância com o emprego do software Prism (GraphPad Software).

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de disco difusão a bactéria *Staphylococcus aureus* foi sensível ao antibiótico Cloranfenicol, porém quanto as concentrações de nanopartículas de prata, embora tenham apresentado certa inibição, os valores não foram considerados significativos quando comparados ao controle positivo. Como mostra a Figura 1.

Figura 1. Tratamentos com antibiótico Cloranfenicol (controle positivo) e concentrações obtidas a partir das nanopartículas de prata frente à bactéria *Staphylococcus aureus*. * indica

diferença estatística significativa entre o tratamento usado e o controle pelo teste de Dunnet a 5% de significância.

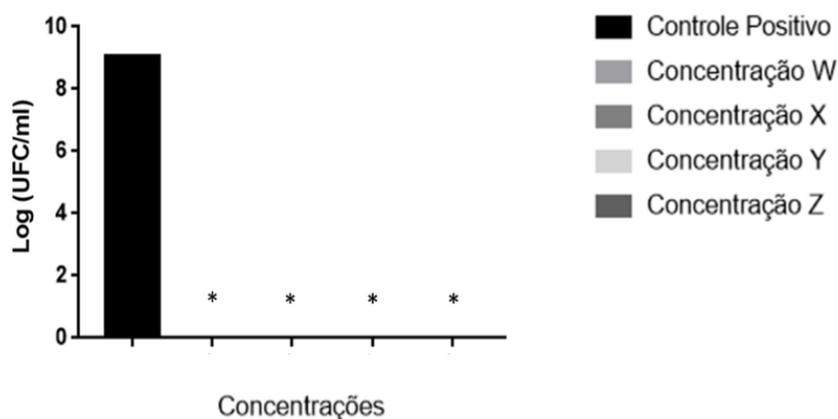


Fonte: GraphPad Prism 7.

O antibiótico comercial cloranfenicol foi eficiente no controle do patógeno, atingindo média de 27 mm com halos de inibição. Diferente das demais concentrações, onde embora tenham expressado certa inibição, não foram significativas. Ainda, de acordo com Sangaleti (2017), são considerados halos inibitórios apenas quando se apresenta inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro. Fato esse não obtido pelas concentrações, com máxima inibição obtida na concentração Z, com média de 9 mm.

Pela técnica de CMB, foi realizado o plaqueamento e contagem de UFC para confirmar se as células bacterianas estariam viáveis ou não. De acordo com a Figura 2, não houve crescimento microbiano nas concentrações, onde obteve-se resultado significativo de redução bacteriana.

Figura 2. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) dos tratamentos com as concentrações obtidas a partir das nanopartículas de prata frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, bem como o controle. * indica diferença estatística significativa entre o tratamento usado pelo teste de Dunnet a 5% de significância.



Fonte: GraphPad Prism 7.

Dessa forma, conforme indicado pela Figura 2 não houve células bacterianas viáveis nas contagens de unidade formadora de colônias (UFC) para as concentrações testadas, havendo crescimento apenas no controle positivo. Comprovando a ação bactericida para todas as concentrações testadas.

3. CONCLUSÃO

Portanto, conclui-se que a nanopartícula de prata apresentou ação antibacteriana frente a *S. aureus*. Ainda, busca-se prosseguir com estudos mais aprofundados entorno das nanopartículas de prata como um antibacteriano alternativo.

REFERÊNCIAS

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4 ed.

CLSI document VET 08. Wayne, 2018. GRINDAL, R.J. **The role of the milking machine in mastitis**. Br Vet J, v.144, p.524-533, 1988.

NECULAI-VALEANU, A. S., et al. **Nanomaterials and Essential Oils as Candidates for Developing Novel Treatment Options for Bovine Mastitis**. Animals. (2021) DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11061625> PRESTES, D. S. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam- Uma revisão. Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia, v. 9, n. 1, p. 48-59, 2003. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2153> Acesso em 30 set 2021.

SANGALETI, T. P.; GEROMEL, M. R. Atividade antibacteriana de extratos aquosos de açafraão, cominho, estragão, endro e tomilho. **Higiene Alimentar**, Catanduva, Sp, p.113-117, mar. 2017. Disponível em <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/05/833405/266-267-site-113-117.pdf> Acesso em 11/09/2023.

PRESTES, D. S. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam- Uma revisão. **Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 48-59, 2003. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2153> Acesso em 30 set 2021.

SILVA N, RUEGG PL. **Uma revisão de 100 anos: detecção, gerenciamento e prevenção de mastite**. J Dairy Sci. (2017) 100: 10381–97. doi: 10.3168 / jds.2017-13023.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of IDF, 345, p.15- 18, 2000. YAH, C.S.; SIMATE, G.S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.43, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4557602/> Acesso em 30 set 2021.

YUAN, Y.; PENG, O.; GURUNATHAN, S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.569, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28272303> Acesso em 30 set 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Federal Catarinense – campus Concórdia pela oportunidade de estudo e infraestrutura disponibilizada e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.