

ATIVIDADE DE HETEROPOLIÁCIDOS SOBRE FUNGOS E BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA

Gossani C.M.D.¹, Mathias L.S.², Passoni L.C.,³ Vieira-da-Motta O.⁴

¹UENF/Laboratório de Sanidade Animal, cmdgossani@gmail.com

²UENF/Laboratório de Sanidade Animal, lcsmathias@gmail.com

³UFJF/Laboratório de Ciências Química, luis.passoni@gmail.com

⁴UENF/Laboratório de Sanidade Animal, olney@uenf.br

Resumo - Doenças fúngicas causadas por *Sporothrix schenckii* e *Candida* spp. afetam humanos e animais de produção/estimação e representam um desafio na busca de novas terapias, principalmente devido ao fenômeno de resistência. Doenças bacterianas causadas por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* provocam graves infecções em animais e em humanos podendo ser causadoras de infecções hospitalares. Os heteropoliácidos (HPAs) são produtos sintéticos que apresentam atividade biológica sobre microrganismos de relevância humana e animal. Este trabalho visa à pesquisa de atividade biológica *in vitro* dos HPAs sobre *S. schenckii*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* como uma proposta terapêutica nas doenças animais e humanas causadas por estes microrganismos. Utilizando as técnicas de difusão em ágar e diluição em meio líquido, os agentes submetidos aos tratamentos com os HPAs (0,28µM) tiveram o crescimento inibido variando com a espécie. Efeitos significativos foram obtidos frente aos microrganismos testados, apresentando maior efeito inibitório sobre as bactérias do que sobre os fungos. Os resultados mostraram potencial atividade antimicrobiana dos HPAs.

Palavras-chave: Heteropoliácidos, atividade, microrganismos, inibição.

Área do Conhecimento: Medicina Veterinária

Introdução

Doenças fúngicas emergentes, como a esporotricose (*S. schenckii*) e a candidíase (*Candida* spp), se encontram entre as principais patologias causadas por fungos tanto na medicina veterinária como na medicina humana (PERLROTH et al., 2007; RAMOS & SILVA et al., 2007). Além disso, as doenças bacterianas causadas por *S. aureus* (NOSKIN et al., 2007), *E. coli* (WU et al., 2006) e *P. aeruginosa* (KOLA et al., 2010) são mundialmente conhecidas como patógenos nas infecções hospitalares, além de serem causadores de diversas infecções em animais

de produção e de estimação e em humanos (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007; VINCENT et al., 2010; SWINNEY et al., 2008). Heteropoliácidos foram eficazes na inibição do crescimento de *M. pachydermatis* (SILVA et al., 2005), cepas de *Candida* spp e *S. aureus* (DIAS et al., 2004 a,b). Os heteropoliácidos potencializaram o efeito de antibióticos β-lactâmicos contra bactérias resistentes à metilicina (YAMASE, et al., 1996). A resistência à drogas entre os microrganismos tem crescido de forma preocupante no mundo (NOSKIN et al., 2005) e tais ocorrências

suscitam novos estudos de princípios farmacológicos.

Metodologia

Síntese dos HPAs

A partir da fórmula genérica $Hn[XM_{12}O_{40}]$, os átomos H, X e M foram substituídos e obtidos sais de HPAs. Os oxoânions $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $NaVO_3 \cdot H_2O$, $Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$, Na_2HPO_4 foram utilizados nas reações para obtenção dos seguintes HPAs: $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$, $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ e $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$. Para a obtenção dos sais de HPAs adicionou-se excesso de solução aquosa concentrada de $AgNO_3$.

Ensaio de inibição em meio líquido

Utilizou-se para o estudo da inibição de crescimento as cepas: *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 28707, *S. schenckii* ATCC 0199, *S. schenckii* cepa clínica, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* cepa clínica (LSA 88), *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* cepa clínica, *P. aeruginosa* ATCC 29336, *P. aeruginosa* cepa clínica, na presença de $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$, $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ e $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$ na concentração de $0,28\mu M$.

Preparou-se uma solução de inóculo com densidade óptica igual a 0,5 McFarland, segundo leitura realizada pelo espectrofotômetro Densimat (bioMérieux, França) com feixe de 550nm. Com o auxílio de uma micropipeta, distribuiu-se um volume de 1900 μL de caldo Sabouraud dextrose quando *Candida* ou caldo BHI quando bactérias e *S. schenckii* a três tubos de ensaio, uma vez que os ensaios foram realizados em triplicata. Estes três tubos receberam os rótulos “controle”. Adicionou-se então 100 μL da solução de inóculo do microrganismo em cada tubo. Em outros três tubos, rotulados como

“tratamento” adicionou-se 1800 μL de caldo Sabouraud ou BHI, 100 μL da solução de inóculo D.O. 0.5McF do microrganismo e 100 μL da suspensão dos HPAs testados.

Após estes procedimentos os tubos foram levados à estufa a 37°C, e realizaram-se leituras periódicas de densidade óptica até que os controles sem tratamento atingissem a capacidade máxima de leitura do fotômetro.

Ensaio de difusão em agar

Utilizou-se para o ensaio de difusão em Agar Mueller-Hinton as cepas: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* cepa clínica (LSA 88), *Pseudomonas* cepa clínica, *E. coli* ATCC 25922 na presença de $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$, $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ e $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$.

Preparou-se uma solução estoque de cada inóculo com densidade óptica igual a 0,5 McFarland, segundo leitura realizada pelo espectrofotômetro Densimat (bioMérieux, França) com feixe de 550nm. Aliquotas de 100 μL do inóculo dos fungos ou bactérias foram semeadas na superfície do meio de cultura, com o auxílio de um suabe estéril. Em cada placa semeada foram perfurados orifícios circulares, com perfurador, de 5,0 mm de diâmetro, onde foram preenchidos com 50 μL (cada) dos HPAs na concentração de $0,28\mu M/mL$ e seus controles positivo e negativo. Após incubação das placas por 24h, em estufa tipo B.O.D. a 37°C, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro.

Resultados

Observou-se que no ensaio de inibição em meio líquido, $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ exibiu efeito inibitório para o crescimento das cepas de *Candida* testadas, enquanto que o HPA

$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou moderada inibição em ambas cepas comparando-se com seus respectivos controles. Os resultados estão apresentados na Figura 1.

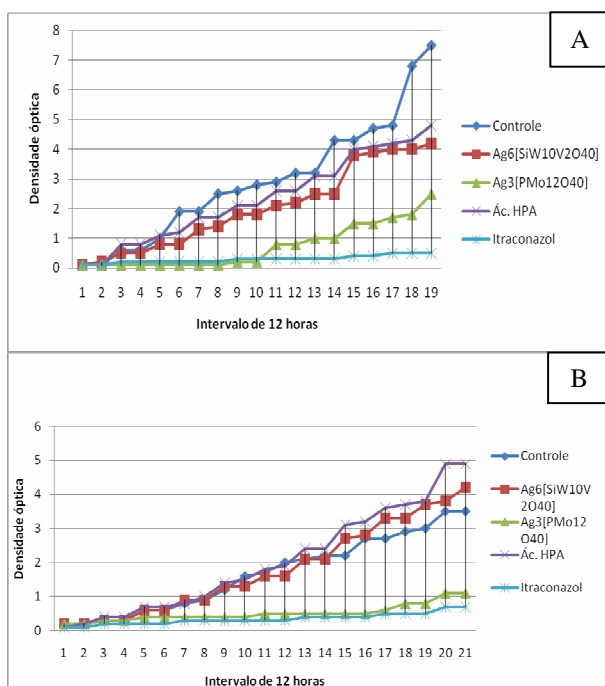


Figura 1: Curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 (gráfico A) e *C. tropicalis* ATCC 28707 (gráfico B) na presença de soluções dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ nas concentrações de 30,04 µg e 45,60 µg, respectivamente, em meio Caldo Sabouraud.

O sal de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiu efeito inibitório para o crescimento das duas cepas de *S. schenckii* testadas, enquanto que o $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não inibiu o crescimento da cepa clínica, mas inibiu moderadamente a cepa ATCC 0199. Os resultados estão apresentados na figura 2.

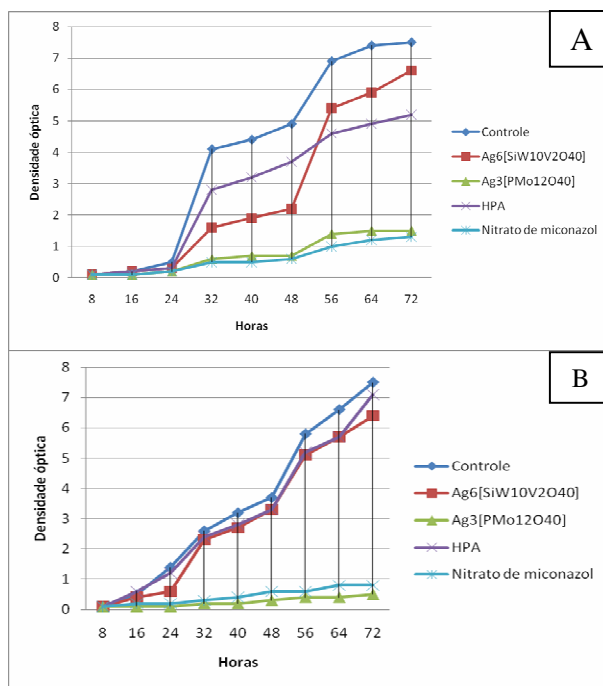


Figura 2: Curva de crescimento de *S. schenckii* ATCC 0199 (gráfico A) e cepa clínica (gráfico B) na presença de soluções dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ nas concentrações de 30,04 µg e 45,60 µg, respectivamente, em meio Caldo BHI.

Observou-se que os sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiram efeito inibitório para o crescimento de todas as cepas de bactérias testadas, enquanto que o $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não apresentou inibição do crescimento em nenhuma das cepas. Os resultados estão apresentados nas Figuras 3,4 e 5.

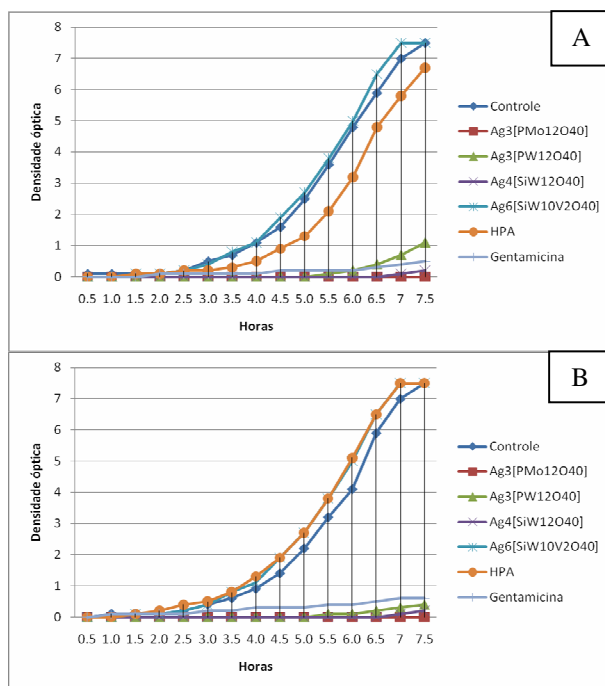


Figura 3: Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 (gráfico A) e cepa clínica (gráfico B) na presença de soluções dos sais de HPAs Ag₃[PMo₁₂O₄₀], Ag₃[PW₁₂O₄₀], Ag₄[SiW₁₂O₄₀] e Ag₆[SiW₁₀V₂O₄₀] nas concentrações de 30,04 µg, 46,28 µg, 46,28 µg e 45,60 µg, respectivamente em meio caldo BHI.

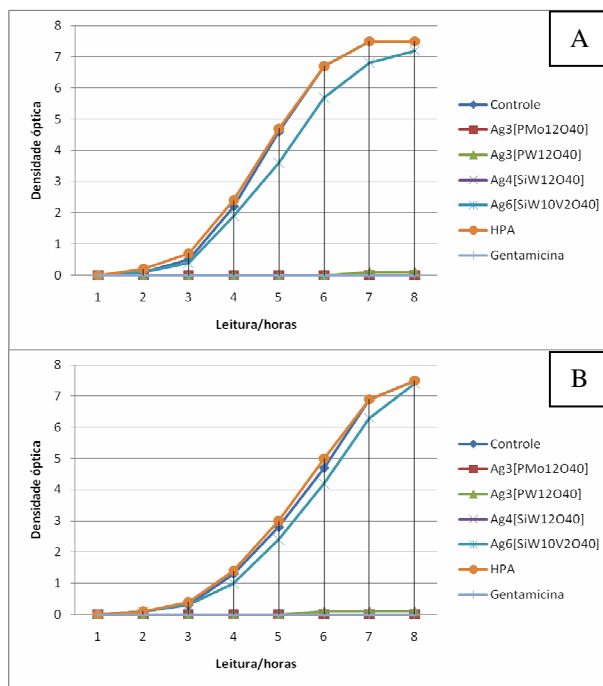


Figura 4: Curva de crescimento de *E. coli* ATCC 25922 (gráfico A) e cepa clínica (gráfico B) na presença de soluções dos sais de HPAs Ag₃[PMo₁₂O₄₀], Ag₃[PW₁₂O₄₀], Ag₄[SiW₁₂O₄₀] e Ag₆[SiW₁₀V₂O₄₀] nas concentrações de 30,04 µg, 46,28 µg, 46,28 µg e 45,60 µg, respectivamente em meio caldo BHI.

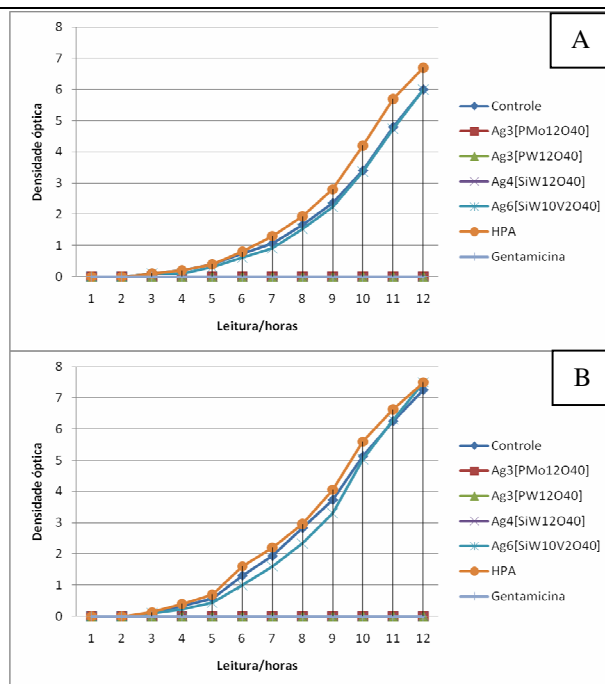


Figura 5: Curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 29336 (gráfico A) e cepa clínica (gráfico B) na presença de soluções dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ nas concentrações de 30,04 μg , 46,28 μg , 46,28 μg e 45,60 μg , respectivamente em meio caldo BHI.

Na utilização dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ no ensaio de inibição em ágar houve formação de halos em todas as cepas bacterianas testadas, comparando-se com os controles. Enquanto que o $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não apresentou inibição em nenhuma das cepas. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

Halo de Inibição (mm de diâmetro)				
Microrganismos	<i>P. aeruginosa</i> Clínica	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. aureus</i> (LSA 88)
HPAs e Controles				
Gentamicina	23	24,5	21,6	23,5
10 μg				
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$	18	15	13,5	13,8
30,04 μg				
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$	18	15	14,1	14,1
46,28 μg				
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$	19	15,3	13,9	14,4
46,28 μg				
$\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	ND	ND	ND	ND
45,60 μg				
HPA 25,55 μg	ND	ND	ND	ND

Figura 6: Halo de inibição obtidos para os sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e ND = Não detectável.

Discussão

SILVA et al. (2005) trabalharam com a levedura causadora de otite infecciosa em animais domésticos e testaram a atividade inibitória de heteropolíácidos em meio sólido e líquido. Com um dos compostos, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, também utilizado neste trabalho, porém em concentração diferente, observaram o efeito inibitório deste sal de HPA. Os autores encontraram maior atividade no HPA com heteroátomo central fósforo do que com silício, enquanto que os resultados dos compostos com os mesmos heteroátomos neste trabalho apresentaram resultados divergentes. No presente trabalho, os fungos *Candida albicans* (Fig. 1 A), *C. tropicalis* (Fig. 1 B) e *S. schenckii* (Fig. 2) apresentaram respostas diferenciadas, onde o composto de silício inibiu discretamente as leveduras testadas, porém o composto de silício utilizado por Silva et al. (2005) contra a levedura *Malassezia pachydermatis* apresentava

composição diferente daquela utilizada neste trabalho. Bau (2006), também testou o HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ sobre diferentes espécies de *Candida*, com resultados de inibição que variaram de acordo com a espécie da levedura testada, mostrando que os fungos podem responder de forma diferenciada. Maiores investigações sobre a atividade do referido HPA nas diferentes concentrações são necessárias.

Os resultados da atividade dos HPAs ilustrados nos gráficos anteriores, contra as bactérias *S.aureus* LSA88 e ATCC 25923, mostraram que os dois novos compostos do metal de transição tungstênio (W) ($\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$) inibiram o crescimento de ambas as cepas (Fig. 3), apresentando um perfil semelhante ao de outros autores (Dias et al., 2004).

Conclusão

A análise dos resultados da aplicação dos sais de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, provaram eficiência na inibição do crescimento de bactérias e fungos testados, enquanto que o sal de HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não apresentou inibição significativa sobre as cepas testadas.

No ensaio de inibição em meio de cultura líquido, observou-se que os sais de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ tiveram efeito fungistático e bacteriostático sobre os cultivos de todas as cepas testadas.

Os ensaios de difusão em ágar demonstraram a sensibilidade dos microrganismos testados aos sais de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, pela formação de halos de inibição ao redor dos poços preenchidos com os mesmos.

Referências

- AIRES-DE-SOUSA M.; PARENTE C.E.S.R.; VIEIRA-DA-MOTTA O.; BONNA I.C.F.; SILVA D.A.; LENCASTRE H. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied And Environmental Microbiology** 73(12): 3845–3849, 2007.
- BAU E.P.L. Atividade *in vitro* do sal $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ sobre as leveduras *Candida albicans* e não-albicans. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006.
- DIAS A.D.; VIEIRA-DA-MOTTA O.; PASSONI L.C. Atividade de heteropoliácidos sobre *Candida albicans*. In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino-americano de Química, Salvador, 2004.
- DIAS A.D.; VIEIRA-DA-MOTTA O.; PASSONI L.C. Atividade de heteropoliácidos sobre *Staphylococcus aureus*. In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química, Salvador, 2004.
- JANSEN R. J. J.; VAN VELDHUIZEN H. M.; VAN BEKKUM H. Heteropoly anion on carbon: characterization and use in 2,3,6-trimethylphenol oxidation. **J. Molecular. Catalysis A: Chemical** 107: 201- 246, 1996.
- KOLA A.; SCHWAB F.; BA RWOLFF S.; ECKMANN S. T.; WEIST K.; DINGER E.; KLARE I.; WITTE W.; RUDEN H.; GASTMEIER P. Is there association between nosocomial infection rates and bacterial cross transmissions? **Crit Care Med.** 38: 46-50, 2010.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 8th edition. National

Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2003.

NOSKIN G.A.; RUBIN R.J.; SCHENTAG J.J.; KLUYTMANS J.; HEDBLUM E.C.; JACOBSON C.; SMULDERS M.; LAPETINA E.; GEMMEN E. The Burden of *Staphylococcus aureus* Infections on Hospitals in the United States An Analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. **Arch Intern Med.** 165: 1756-1761, 2005.

NOSKIN G.A.; RUBIN R.J.; SCHENTAG J.J.; KLUYTMANS J.; HEDBLUM E.C.; JACOBSON C.; SMULDERS M.; GEMMEN E.; BHARMAL M. National Trends in *Staphylococcus aureus* Infection Rates: Impact on Economic Burden and Mortality over a 6-Year Period (1998–2003). **Clinical Infectious Diseases.** 45: 1132–40, 2007.

PERLROTH J.; JHOIS B.; SPELLBERG B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology** 45: 321-346, 2007.

RAMOS-E-SILVA M.; VASCONCELOS C.; CARNEIRO S.; CESTARI T. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology** 25: 181–187, 2007.

SILVA M.J.R.; GONÇALVES D.S.; DEUS M.F.; SANTOS A.V.; PASSONI L.C.; SAMUELS R.I.; VIEIRA-DA-MOTTA O. Susceptibilidade de *Malassezia pachydermatis* a compostos naturais e sintéticos. XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005

SWINNEY A.; FAZAKERLEY J.; MCEWAN N.; NUTTALL T. Comparative in vitro antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. **Journal Compilation ESVD and ACVD** 19: 373–379, 2008.

TSIGDINOS G.A. Heteropoly Compounds of Molybdenum and Tungsten. **Top. Curr.** 76, (1), 1978.

VINCENT C.; BOERLIN P.; DAIGNAULT D.; DOZOIS C. M.; DUTIL L.; GALANAKIS C.; REID-SMITH R. J.; TELLIER, P.;

TELLIS P.A.; ZIEBELL K.; MANGES A.R. Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases** 16: 1-18, 2010.

WU C.; LEE H.; LEE N.; SHIH H.; KO N.; WANG L.; KO W. Predominance of Gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern Taiwan, 1996-2003. **J Microbiol Immunol Infect** 39: 135-143, 2006.

YAMASE T.; FUKUDA N.; TAJIMA Y. Synergistic Effect of Polyoxotungstates in Combination with β -Lactam Antibiotics on Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Biol. Pharm.** 19(3): 459- 465, 1996.