



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

VIVIANE FERREIRA CARDOZO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS DOADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO CONTRA  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *ESCHERICHIA COLI***

VIVIANE FERREIRA CARDOZO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS DOADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO CONTRA  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *ESCHERICHIA COLI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson  
Nakazato

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amedea B.  
Seabra

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cardozo, Viviane Ferreira .

Atividade antibacteriana de nanopartículas poliméricas doadoras de óxido nítrico contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* / Viviane Ferreira Cardozo. - Londrina, 2017. 78 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Coorientador: Amedea Barozzi Seabra.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2017.

Inclui bibliografia.

1. Atividade antibacteriana - Tese. 2. Nanopartículas poliméricas - Tese. 3. Óxido nítrico - Tese. I. Nakazato, Gerson . II. Barozzi Seabra, Amedea. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

VIVIANE FERREIRA CARDOZO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS DOADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO CONTRA  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *ESCHERICHIA COLI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura  
Universidade Estadual de Maringá- UEM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Carolina Vespero  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko Takayama  
Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Audrey Alesandra Stingham Garcia  
Lonni  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de setembro de 2017.

Por plantarem em mim a semente do saber e permitirem que mais esse sonho se realizasse, dedico este trabalho aos meus queridos pais.

“Somos do tamanho dos nossos sonhos”

Fernando Pessoa

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelos dons da sabedoria, inteligência e perseverança. Por estar ao meu lado sempre e em todo lugar. Pelas oportunidades apresentadas em meu caminho. Por ser minha base e meu tudo. À Virgem Maria por me adotar como filha, sendo sempre uma mãe zelosa e presente.

À minha mãe, Angelina Bossa Cardozo, por todo seu sacrifício pelos filhos e apoio, por sempre acreditar em minha capacidade e permitir que este trabalho fosse realizado; nosso alicerce familiar.

Ao meu pai, Valdomiro Ferreira Cardozo, por permitir que esse sonho se realizasse e acreditar que sou capaz, ajudando a vencer todas as dificuldades e por todo seu apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela oportunidade, acolhimento, ensinamentos, paciência; pelo ser humano maravilhoso que é, além de um profissional exemplar.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko Takayama Kobayashi, pelo carinho e ajuda em momentos de dúvidas, pelos ensinamentos compartilhados, pela sua paciência maternal e amabilidade.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amedea Barozzi Seabra, por compartilhar seus ensinamentos e produtos, aceitar nosso convite e fazer parte dessa longa jornada.

Aos companheiros de laboratório por sua receptividade, sanarem minhas dúvidas, auxiliarem no desenvolvimento dos experimentos e companheirismos por todos esses anos.

Aos amigos queridos, por nossas conversas, risadas, comilanças, conselhos, estímulos e por sempre torcerem por mim.

Aos colegas e amigos da turma do Doutorado em Microbiologia pelo convívio, aprendizagem, experiências compartilhadas.

A todos os professores que contribuíram para meu aprendizado, compartilhando seus conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade, ensinamentos e aprimoramento dos meus conhecimentos.

Aos componentes da Banca de Qualificação, por me ajudarem na melhor composição deste trabalho e compartilharem seus conhecimentos.

Aos componentes da Banca de Doutorado por aceitarem o convite, compartilharem seus conhecimentos e dedicarem seu tempo a este trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, UNIFESP, CAPES, CNPq e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro e apoio para que esse trabalho se realizasse.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu mais profundo e sincero: **Muito Obrigada!**

CARDOZO, V.F. **Atividade antibacteriana de nanopartículas poliméricas doadoras de óxido nítrico contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2017. Tese de Doutorado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Paraná, Brasil.

## RESUMO

A mastite bovina é uma grave enfermidade veterinária que causa grande perda para a indústria de laticínios em todo o mundo. Ela é uma das principais doenças infecciosas, e é de difícil tratamento e controle. Além disso, o surgimento de bactérias multirresistentes que causam a mastite tem complicado o seu controle. O radical livre óxido nítrico (NO) é um potente agente antimicrobiano. Assim, o objetivo deste estudo foi sintetizar partículas poliméricas doadoras de NO, e avaliar a atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* (MBSA) e *Escherichia coli* (MBEC) isoladas de mastite bovina. Quinze isolados de MBSA e quinze de MBEC foram obtidos de vacas com mastite bovina subclínica e clínica. Partículas poliméricas biocompatíveis compostas de alginato/quitosana, ou quitosana/tripolifosfato de sódio (TPP), foram sintetizadas e utilizadas para encapsular o ácido mercaptosuccínico (MSA), que é uma molécula contendo tiol. A nitrosação de grupo tiol em partículas contendo MSA formaram as partículas S-nitroso-MSA, que são doadoras de NO. A cinética de liberação das partículas de S-nitroso-MSA mostrou liberação de NO constante e controlada durante várias horas. A atividade antibacteriana das partículas liberadoras de NO foi avaliada pela incubação das nanopartículas com uma cepa de MBSA multirresistente, o qual é responsável por causar mastite bovina. Ensaio de atividade anti-biofilme na formação e em biofilmes maduros foram realizados utilizando as cepas de *S. aureus* e as partículas poliméricas de S-nitroso-MSA liberadoras de NO. A concentração mínima inibitória das partículas de S-nitroso-MSA-alginato/quitosana contra cepas de MBSA variou de 125 a 250 µg/mL. As mesmas nanopartículas apresentaram atividade anti-biofilme nas concentrações de 250 e 500 µg/mL para as cepas de MBSA. Os resultados indicam que o uso de partículas poliméricas doadoras de NO é uma interessante alternativa para combater a resistência bacteriana no tratamento e prevenção da mastite bovina.

**Palavras chaves:** Atividade antibacteriana. Mastite bovina. *Escherichia coli*. Óxido nítrico. Nanopartículas poliméricas. *Staphylococcus aureus*.

CARDOZO, V.F. **Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis.** 2017. Thesis os Doctoral in Microbiology, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Paraná, Brazil.

## ABSTRACT

Bovine mastitis is a serious veterinary disease that causes great loss to the dairy industry worldwide. It is a major infectious disease and is difficult to manage and control. Furthermore, emerging multidrug resistant bacteria that cause mastitis have complicated such management. The free radical nitric oxide (NO) is a potent antimicrobial agent. Thus, the aims of this study were to prepare and evaluate the antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* (MBSA) and *Escherichia coli* (MBEC), which were isolated from bovine mastitis. Fifteen MBSA isolates and fifteen MBEC were collected from subclinical and clinical bovine mastitis. Biocompatible polymeric particles composed of alginate/chitosan or chitosan/sodium tripolyphosphate (TPP) were prepared and used to encapsulate mercaptosuccinic acid (MSA), which is a thiol-containing molecule. Nitrosation of thiol groups of MSA-containing particles formed S-nitroso-MSA particles, which are NO donors. The NO release kinetics from the S-nitroso-MSA particles showed sustained and controlled NO release over several hours. The antibacterial activity of NO-releasing particles was evaluated by incubating the particles with an MBSA multi-resistant strain, which is responsible for bovine mastitis. Anti-biofilm activity assays on the formation and mature biofilms were performed using nitric oxide-releasing S-nitroso-MAS polymeric particles and *S. aureus* strains. The minimum inhibitory concentration for S-nitroso-MSA-alginate/chitosan particles against MBSA ranged from 125 µg/mL to 250 µg/mL. The same nanoparticles showed anti-biofilm activity at the concentrations of 250 e 500 µg/mL against MBSA strains. The results indicate that NO-releasing polymeric particles are an interesting approach to combating bacteria resistance in bovine mastitis treatment and prevention.

**Keywords:** Antibacterial activity. Bovine mastitis. *Escherichia coli*. Nitric oxide. Polymeric particles. *Staphylococcus aureus*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxiribonucleico
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
GSNO	S-nitrosoglutathion
H	Antígeno flagelar
ITU	Infecções do Trato Urinário
K	Antígeno capsular
MBEC	<i>Escherichia coli</i> isolada de mastite bovina
MBSA	<i>Staphylococcus aureus</i> isolado de mastite bovina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MAS	Ácido mercaptosuccínico
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
NO <sup>2-</sup>	Dióxido de nitrogênio
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido nitroso
O	Antígeno somático
(ONOO)	Peroxinitrito
RNA	Ácido ribonucleico
RSHs	Tióis de baixo peso molecular
RSNOs –	S nitrosotióis
TPP	Tripolifosfato de sódio
VP	Voges-Proskauer
MR	Multirresistente

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	16
2.3.	Mastite bovina .....	17
2.4.	Óxido nítrico .....	19
2.5.	Nanopartículas poliméricas .....	21
2.6.	Biofime .....	26
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
4.	ARTIGO .....	37
5.	CONCLUSÃO .....	72
	ANEXO .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas têm sido um grande problema para a saúde pública, principalmente quando essas bactérias apresentam multirresistência aos antimicrobianos convencionais. As fontes de contaminação são variadas, podendo ser transmitidas pelo homem, outros animais, e alimentos.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos vem se destacando nos últimos anos, e existe uma enorme preocupação com a falta de antimicrobianos eficazes contra os microrganismos multirresistentes. Para resolver tal situação, novos antimicrobianos (naturais, sintéticos e semissintéticos) e novas estratégias (combinações de fármacos, liberação controlada e terapias alternativas) têm sido estudados em diferentes áreas e setores de produção.

Um das alternativas viáveis para tal finalidade é o emprego da nanotecnologia, por meios de nanopartículas que podem apresentar atividade antimicrobiana ou liberação controlada de compostos como o óxido nítrico, que também apresenta efeito bactericida.

O nosso grupo de pesquisa vem estudando as propriedades antimicrobianas de vários compostos, incluindo nanopartículas (metálicas e poliméricas), para diferentes áreas da Microbiologia.

As nanopartículas poliméricas podem apresentar atividade antimicrobiana, mas ultimamente, a estratégia de liberação controlada tem sido muito explorada em diversos estudos, servindo de modelo de atividades biológicas em diferentes áreas da saúde, como Imunologia (vacinas) e Oncologia (câncer).

Um dos setores que apresenta uma grande problemática na antibioticoterapia, é o agropecuário, tanto no aspecto de produção (econômico), como na saúde pública (zoonose e resistência bacteriana aos antimicrobianos).

A mastite bovina é uma doença crônica causada por diferentes bactérias, caracterizada pela grande dificuldade no tratamento e prevenção, e que tem causado enormes prejuízos na produção leiteira no Brasil e em todo mundo. Além disso, a doença representa um risco para a saúde pública, uma vez que o leite é um alimento altamente consumido pela população mundial.

Assim, neste estudo foi proposta a utilização de nanopartículas poliméricas (baixa toxicidade) com liberação controlada (estratégia) de um importante composto antimicrobiano, o óxido nítrico, para inibir o crescimento de bactérias envolvidas na mastite bovina. Outro aspecto abordado neste estudo foi a eliminação ou prevenção de biofilmes bacterianos pelo uso dessas mesmas nanopartículas, uma vez que esses biofilmes são importantes na persistência bacteriana em diferentes ambientes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus*, pertencente à família Micrococcaceae, é composto por 38 espécies, das quais 17 destas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. São cocos Gram-positivos, medindo cerca de 0,5 -1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e podem apresentar-se isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou grupos em forma de cachos irregulares. As espécies do gênero *Staphylococcus* podem crescer em meios hipertônicos (em concentrações de até 15% de NaCl), em um variado espectro de pHs (de 4,2 a 9,3) e temperaturas (entre 7° C e 48,5 °C) (LE LOIR et al., 2003).

Os membros dessa espécie são imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos; porém, desenvolvem-se melhor em atmosfera aeróbia. Algumas colônias podem apresentar pigmentação amarela, ou amarelo-alaranjado, enquanto outras colônias podem ser esbranquiçadas ou acinzentadas. Além disso, algumas cepas de *Staphylococcus aureus* cultivadas em ágar sangue podem produzir uma zona difusa de  $\beta$ -hemólise ao redor da colônia, evidenciada após incubação prolongada (BANNERMAN et al., 1995; KLOOS, 1997).

Os estafilococos são produtores de catalase, sendo essa prova importante para diferenciá-los dos estreptococos (catalase negativos). Um dos fatores de patogenicidade que diferencia *S. aureus* das demais espécies estafilocócicas é a capacidade de coagular o plasma, por reação direta com o fibrinogênio. Essa reação produz fibrina, que recobre as células bacterianas, permitindo sua rápida aglutinação e resistência aos processos de opsonização e fagocitose. Tal propriedade é conferida tanto pela presença da coagulase livre como pela coagulase ligada, ou fator de agregação na superfície da parede celular (KLOOS, 1997).

Quanto ao *habitat*, as espécies deste gênero encontram-se amplamente distribuídas no ambiente e como microbiota autóctone de seres humanos e outros animais (MURRAY et al., 1999).

A fermentação do manitol, endonuclease termoestável e teste da desoxirribonuclease são provas confirmatórias adicionais utilizadas para a caracterização do patógeno. São microrganismos que se multiplicam sob condições

de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que explica, parcialmente, sua sobrevivência nas secreções nasais e na pele (BANNERMAN, 1995).

O gênero *Staphylococcus* é amplamente encontrado na natureza, sendo parte da microbiota de pele e mucosas de animais. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente caracterizadas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em humanos e outros animais (SAKAI, 2004).

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo de grande importância clínica para humanos, uma vez que é causa comum de diversos processos infecciosos que variam desde infecções cutâneas crônicas relativamente benignas, até infecções humanas potencialmente fatais. As infecções cutâneas incluem foliculites simples e impetigo, assim como furúnculos e carbúnculos, que afetam o tecido subcutâneo, e produzem sintomas sistêmicos como febre. *S. aureus* é frequentemente isolado de feridas cirúrgicas infectadas, que podem representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas, assim como é a causa de broncopneumonias e pneumonias nosocomiais, bacteremias, meningites e peritonites, entre outras infecções (KONEMAN et al., 2001).

*Staphylococcus aureus* e suas cepas resistentes à meticilina (MRSA) são a causa de uma grande parcela de infecções no hospital e na comunidade. Além disso, estima-se que 20% da população global é portador persistente do patógeno, enquanto 60% é portador intermitente. Este patógeno é a causa mais comum de infecções de tecido e pele e outras infecções mais graves, tais como endocardite, osteomielite, bacteremia e pneumonia. Além disso, *S. aureus* é um patógeno predominante em pacientes com fibrose cística, nos quais pode colonizar os pulmões durante um período prolongado (WATER et al., 2015)..

A persistência das infecções por *S. aureus* atualmente está ligada à capacidade das bactérias de invadir as células epiteliais do hospedeiro e sobreviver ao tratamento antibiótico no ambiente intracelular, como também acontece com bactérias intracelulares bem conhecidas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*. O mecanismo exato da persistência intracelular de *S. aureus* não é totalmente compreendido e sua elucidação está em andamento (WATER et al., 2015).

Este microrganismo é a principal causa de infecções bacterianas Gram-positivas, e responsável por um amplo espectro de doenças, variando de infecções mais simples até as mais complexas. Embora as infecções por *S. aureus* sejam historicamente tratáveis com antibióticos comuns, o surgimento de microrganismos MR tornou-se uma grande preocupação para a saúde pública (TSERING, 2011).

*Staphylococcus aureus* é um importante patógeno que causa infecções nosocomiais, e adquiridas por pessoas na comunidade; e também é responsável por doenças em animais. Este microrganismo ubíquo está presente assintomaticamente em 20-30% da população humana. Provoca uma ampla gama de infecções, incluindo infecções cutâneas e de tecidos moles, mastite, óssea, articulação, e infecções em implantes, pneumonia e septicemia. Pode ser a causa de doença em animais, mas é economicamente mais significativo como causa da mastite bovina (HOLMES; ZADOK, 2011).

*Staphylococcus aureus* também é um importante agente etiológico de infecções em animais de companhia e de animais destinados à produção de alimentos (AARESTRUP et al., 2000; ZADOKS et al., 2000). Esse microrganismo constitui-se no agente bacteriano mais comumente isolado de casos de mastite bovina clínica e subclínica, sendo apontado pela *International Dairy Federation* como patógeno principal (LANGONI, 1999).

A alta frequência de mastite causada por *S. aureus* em rebanhos leiteiros ocorre devido à sua alta infectividade associada a fatores de virulência, que conferem ao microrganismo a capacidade de se instalar no parênquima mamário, formar microabscessos, resistir à fagocitose e sobreviver no interior de fagócitos, restringindo, dessa forma, o acesso dos agentes antimicrobianos, mesmo quando administrados em concentrações terapêuticas (ARAÚJO; ANDRIOLI, 1996).

## **2.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, espécie importante da família Enterobacteriaceae, não esporulado, oxidase negativa, anaeróbio facultativo, que pode ou não apresentar motilidade. Em meios de cultura seletivos e diferenciais, a *Escherichia coli* apresenta distintas características coloniais, produzindo colônias

negras esverdeadas com brilho metálico em ágar eosina-azul de metileno (EMB) ou colônias rosadas (lactose positivas) em ágar MacConkey. As cepas de *Escherichia coli* estão associadas com as propriedades bioquímicas de fermentação de lactose, produção de indol a partir do triptofano, fermentação de glicose pela via de ácidos mistos (prova de vermelho de metila positiva) e Voges-Proskauer negativo. Não produzem H<sub>2</sub>S, DNase, urease ou fenilalanina desaminase e não utilizam citrato como fonte de carbono. A maioria das cepas de *Escherichia coli*, em geral possui adesinas fimbriais, pili sexual, toxinas e antígenos O (lipopolissacarídeo), H (flagelo) e K (cápsula) (BOPP et al., 2003; WINN et al., 2006).

De modo geral, a evolução fez com que algumas cepas de *E. coli* adquirissem genes de virulência através da transferência horizontal. Deste modo, a capacidade de *E. coli* em causar um amplo espectro de doenças humanas vem aumentando (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). *E. coli* é um dos principais agentes de infecções intestinais e extraintestinais em diferentes hospedeiros, e é responsável por importantes patologias como diarreia, sepse e infecções do trato urinário (ITU), causando grandes prejuízos em diversas áreas da saúde (KAPER et al., 2005).

Cepas de *E. coli* relacionadas com infecções extraintestinais são denominadas "*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*" (ExPEC) (JOHNSON; RUSSO, 2000). Já cepas de *E. coli* relacionadas às infecções intestinais, tanto em humanos como em outros animais, são denominadas *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As linhagens de *E. coli* são sorotipadas através de seus principais antígenos de superfície: antígeno somático (O), antígeno flagelar (H), e antígeno capsular (K). Caracterizando-se, portanto, a linhagem em O:H ou O:K:H (BLANCO et al., 1994). Foram descritos mais de 180 antígenos O, 60 antígenos H e 100 antígenos K diferentes, possibilitando inúmeras combinações (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

### **2.3. Mastite bovina**

A mastite é uma grave doença que causa grande perda na indústria de laticínios no mundo todo, sendo uma doença de difícil controle e manejo. A

emergência de bactérias multirresistentes causadoras de mastite têm dificultado seu controle (BHASME et al., 2013). Essa patogenia é uma reação inflamatória da glândula mamária de etiologia infecciosa, traumática, fisiológica ou alérgica. Entretanto, a mastite infecciosa é considerada a mais importante, por não ser auto-limitante, e por poder eventualmente evoluir para um quadro de septicemia (COSTA, 2003).

As mastites podem ser classificadas como clínicas ou subclínicas. É considerada mastite clínica quando há alterações macroscópicas no leite e/ou no úbere do animal. A severidade da mastite clínica pode variar desde uma manifestação clínica branda até uma mastite clínica severa, na qual ocorre sintomatologia sistêmica, com elevação da temperatura corporal, desidratação e inapetência, sendo possível, em alguns casos, resultar em óbito (CHAFER, 2006). Já a mastite subclínica não possui sintomatologia evidente, e se caracteriza principalmente pela diminuição da produção leiteira, sem que sejam observados sinais visíveis do processo inflamatório na glândula mamária ou no leite (COSTA, 2002).

As perdas econômicas associadas à mastite clínica nos Estados Unidos foram estimadas aproximadamente em US\$ 179 por caso de mastite. Essas perdas são calculadas a partir da produção reduzida de leite, leite descartado, aumento da taxa de abate, custos farmacológicos e aumento de mão-de-obra (BALLOU, 2012). A resistência à meticilina em isolados de *S. aureus* obtidos a partir de casos de mastite bovina foi relatada pela primeira vez na Bélgica em 1970, com base no teste de sensibilidade antimicrobiana, mas sem confirmação da presença de um gene *mecA* (HOLMES; ZADOK, 2011).

Os patógenos contagiosos são microrganismos particularmente adaptados à sobrevivência no hospedeiro, especialmente na glândula mamária. Eles são capazes de estabelecer infecções subclínicas e são transmitidos principalmente durante a ordenha (BRADLEY, 2002; COSTA, 2003). Microrganismos do gênero *Staphylococcus* estão entre os mais frequentemente isolados em amostras de leite provenientes de vacas com mastite contagiosa, sendo *S. aureus* a espécie de maior frequência (COSTA et al., 1986).

*E. coli* é conhecida por ser a bactéria Gram-negativa mais comum que causa mastite subclínica e exibe resistência a antibióticos. No entanto, a *E. coli* patogênica no meio ambiente tem sido frequentemente negligenciada. Muitos estudos relataram a presença de *E. coli* entre os casos de mastite subclínica em fazendas leiteiras em muitas regiões do mundo, particularmente em países em desenvolvimento, como Uruguai, Turquia, Brasil, Etiópia, México e China. Sabe-se da existência de *E. coli* patogênica em fontes ambientais e também no leite de vacas com mastite subclínica, detectando genes específicos associados aos tipos patogênicos dessa espécie (HINTHONG et al., 2017).

## 2.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula biologicamente ativa normalmente encontrada em mamíferos, atuando como agente neurotransmissor, citoprotetor e citotóxico (IGNARRO, 2000). Esta molécula pode atuar como mensageiro entre as células dos animais superiores, incluindo os humanos (MARTINEZ-RUIZ; LAMAS, 2009).

O NO é um radical livre, no meio celular existem muitas espécies capazes de desativá-lo imediatamente. Tióis de baixo peso molecular (RSHs), encontrados no plasma humano, são facilmente nitrosados na presença de  $N_2O_3$  ou  $NO_2^-$ , gerando os S-nitrosotióis (RSNOs), que são significativamente mais estáveis que o NO (SHISHIDO et al., 2003).

À luz da crescente resistência dos patógenos aos antimicrobianos, novas direções no desenvolvimento antimicrobiano devem ser perseguidas. O uso de NO como agente antimicrobiano é elementar, a forma como o NO fisiológico é gerado e combate os organismos invasores são bem compreendidos. Nanopartículas doadoras de NO já demonstraram atividade bactericida *in vitro* e *in vivo* contra microrganismos Gram positivos e negativos (FRIEDMAN et al., 2011).

Considerando que o NO é uma parte integrante e altamente conservada da resposta imune do hospedeiro, não é surpreendente que poucas bactérias possam escapar do efeito antimicrobiano de NO. Múltiplos sistemas de entrega de NO foram desenvolvidos, cada um tentando fornecer NO de forma segura, eficaz e de maneira

conveniente. Embora apenas um pequeno subconjunto de sistemas de entrega de NO tenha sido avaliado quanto à eficácia antimicrobiana, aqueles que foram avaliados são bacteriostáticos ou bactericidas. O sucesso dos sistemas de entrega de NO no tratamento de modelos laboratoriais de infecção provocou o desenvolvimento contínuo desta promissora tecnologia (SCHAIRER et al, 2012).

Ele é uma molécula de sinalização celular envolvida em muitos processos fisiológicos, e uma molécula defensiva contra invasão de patógenos. Diversos doadores de NO, como nitritos / nitratos orgânicos, nitrosotióis e diazeniumdiolatos, foram projetados para entregar NO para alvos biológicos e obter as respostas desejadas (HO et al., 2011).

NO é um agente antimicrobiano, que pode inibir ou matar uma ampla gama de microrganismos, pode interagir e alterar os tióis de proteínas e centros metálicos em condições adequadas; bloqueando processos fisiológicos microbianos essenciais, incluindo respiração e replicação do DNA. Moléculas reativas derivadas de NO como o peroxinitrito (ONOO), podem induzir danos oxidativos à maquinaria central dos patógenos. Além disso, essas espécies podem iniciar reações de peroxidação lipídica, aumentando o poder antimicrobiano do NO. Nas bactérias sujeitas a este estresse nitrosativo, a S-nitrosoglutationa (GSNO) é formada por reação de NO com glutatona intracelular na presença de oxigênio. GSNO é fundamentalmente um doador de NO que pode transferir espontaneamente NO para outros tióis (trans S-nitrosilação). A maioria dos efeitos farmacológicos dos nitrosotióis é causada pela nitrosação de proteínas celulares que são essenciais a muitos processos fisiológicos (FRIEDMAN et al.,2011)

Devido às várias ações biológicas do NO, incluindo a ação antimicrobiana, existe uma preocupação quanto ao controle da liberação do NO em sistemas vivos, local onde o NO poderia desempenhar seus efeitos terapêuticos (FROST et al., 2005, SEABRA; DURÁN, 2010). Os veículos carregadores e liberadores de NO modulam a cinética de liberação de NO nos tecidos alvos e locais de aplicação (FROST et al., 2005; REYNOLDS et al., 2004; SEABRA et al., 2004(a)).

## 2.5. Nanopartículas poliméricas

A nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar baseado no desenvolvimento, na caracterização, na produção e na aplicação de estruturas e sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica (STYLIOS et al., 2005).

Na nanomedicina, ou seja, no desenvolvimento de tratamentos efetivos baseados na nanotecnologia, ocorre a junção de diferentes áreas, entre elas a biologia, a química, a física, a engenharia química, a engenharia mecânica, a ciência de materiais e a medicina clínica (FAROKHZAD; LANGER, 2006).

No campo da nanotecnologia os sistemas de liberação controlada de fármacos se destacam e têm apresentado um grande avanço (EMERICH; THANOS, 2006). Nas últimas quatro décadas, a tecnologia polimérica de liberação controlada apresentou um impacto nas diferentes áreas da medicina, com diferentes produtos já presentes na prática clínica (FAROKHZAD; LANGER, 2006).

A nanomedicina é um campo interessante de pesquisa de entrega de medicamentos, pois é uma abordagem plausível para a entrega direcionada de medicamentos, como a entrega magnética de fármacos e a liberação controlada desencadeada por temperatura, liberação fotossensível, liberação ativada por micro-ondas e liberação responsiva ao pH. Além disso, a aplicação significativa da nanotecnologia tem sido comprovada na liberação controlada e sustentada de drogas, e esta tecnologia pode minimizar a perda de eficácia ao melhorar a utilização de drogas e seus efeitos terapêuticos. Ao mesmo tempo, as nanopartículas podem ser utilizadas em várias administrações, como entrega oral, injeção subcutânea, administração transdérmica e administração mucosa (YU et al., 2017).

As nanopartículas são sistemas coloidais poliméricos com tamanho entre 10 e 1000 nm (RIEUX et al., 2006), nos quais o fármaco pode se encontrar dissolvido, recoberto, encapsulado ou disperso. Elas são classificadas em duas categorias, as nanoesferas e as nanocápsulas, que diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural (ABDELWAHED et al., 2006).

As vantagens da utilização de nanopartículas incluem a liberação controlada e/ ou prolongada da substância nelas encapsuladas, a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local de ação, o aumento da penetração intracelular e o aumento da atividade farmacológica (TEIXEIRA et al., 2005).

Polímeros naturais podem ser considerados como os primeiros biomateriais utilizados clinicamente. A natureza dos polímeros empregados em sistemas de liberação de fármacos influencia significativamente no tamanho e no perfil de liberação do sistema. Os principais critérios na seleção de um polímero são, principalmente, a biodisponibilidade, a biocompatibilidade e a sua velocidade de degradação (RIEUX et al., 2006).

A seleção de um método apropriado de encapsulamento é importante para ter nanopartículas com o desempenho e a função desejados. O método selecionado dependerá dos caracteres físico-químicos do composto bioativo polimérico, encapsulado e das propriedades desejadas das nanopartículas (por exemplo, tamanho de partícula, distribuição de tamanho de partícula, área de superfície, forma, solubilidade, eficiência de encapsulamento e mecanismo de liberação). Para melhorar a eficiência e a estabilidade das nanoestruturas, também é primordial encontrar materiais adequados; os biopolímeros, como os polissacarídeos, são uma das possibilidades devido às suas vantagens distintas de biodegradabilidade, biocompatibilidade e falta de toxicidade (AZEVEDO et al., 2014).

Nanopartículas poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis têm sido utilizadas como veículos de liberação de NO. Entre os polímeros que podem ser utilizados na preparação destas nanopartículas, destacam-se os polímeros naturais: alginato e a quitosana.

A quitosana é um biomaterial derivado da quitina (essencialmente poli (p-1,4-N-acetil-D-glucose-2-amina)), que é um dos polissacarídeos catiônicos naturais mais abundantes, é encontrado em paredes celulares de microrganismos, tais como leveduras, e também em exoesqueletos de crustáceos e insetos. O produto da desacetilação de quitina é conhecido sob o nome genérico de "quitosana", comumente utilizado em indústrias têxteis e na confecção de biomateriais por apresentar importantes propriedades como baixo custo, biodegradabilidade e

biocompatibilidade. A quitosana tem sido amplamente empregada no desenvolvimento de micro ou nano-transportadores, com foco específico no uso de ativos complexos (NASTI et al., 2009).

O alginato é um polissacarídeo hidrofílico extraído de algas castanhas marinhas da família Phaeophyta. É um biopolímero linear composto por dois ácidos urônicos, sendo grupos carboxílicos de ácidos inorgânicos responsáveis por sua carga negativa. Este biopolímero apresenta propriedade atóxica, biocompatível, biodegradável; é mucoadesivo, sendo aprovado para aplicações farmacêuticas e alimentares. A solubilidade do alginato na água depende dos cátions associados, isto é, o alginato de sódio é solúvel em água; mas quando é utilizada uma solução com cátions multivalentes (por exemplo, cálcio -  $\text{Ca}^{2+}$ ), o biopolímero pode formar um gel reversível (AZEVEDO et al., 2014).

O aprisionamento de NO em doadores na área de nanomateriais surgiu como uma estratégia que poderia proteger essas moléculas de decomposição ou degradação, e permitir uma liberação de NO controlada; prolongando assim seu período de atividade. Nanomateriais apresentam características físico-químicas distintas em comparação com o mesmo material na escala macroscópica. Sucesso foi obtido no encapsulamento de doadores de NO com baixo peso molecular em nanopartículas de quitosana para diferentes aplicações biomédicas, incluindo atividades antimicrobianas contra bactérias e protozoários resistentes; e toxicidade direcionada a várias linhas celulares cancerígenas (OLIVEIRA et al., 2016).

O uso de nanopartículas como veículos de entrega para agentes bactericidas representa um novo paradigma na concepção da terapêutica antibacteriana. Neste estudo, nanopartículas doadoras de NO mostraram-se significativamente eficazes na morte de *Acinetobacter baumannii* multirresistente *in vitro* e, com efeito terapêutico em um modelo de infecção de ferida murina (MIHU et al., 2010).

O NO modula a reconstrução do tecido modificando a resposta inflamatória e angiogênese. Tecidos danificados, como feridas infectadas, são deficientes em NO. Conseqüentemente, a administração de nanopartículas doadoras de NO pode melhorar a cicatrização de feridas, facilitando a morte bacteriana e promovendo a deposição de colágeno (MIHU et al., 2010).

Houve um aumento de interesse na utilização de nanopartículas metálicas como transportadores de NO porque seus tamanhos são comparáveis aos de biomoléculas (por exemplo, proteína e DNA), a sua superfície pode ser ajustada variando a proteção da superfície dos ligantes, e são capazes de liberar múltiplas moléculas de NO por nanopartícula de metal (HO et al., 2011).

Alguns estudos mostraram que nanopartículas liberadoras de NO possuem atividade bactericida (CHOUAKE et al., 2012; FRIEDMAN et al., 2011).

Observou-se que nanopartículas liberadoras de NO apresentaram atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* quando tinham tamanho  $\leq 100$  nm (CARPENTER et al., 2011).

Aplicação de terapia com nanopartículas doadoras de NO contra microrganismos notáveis por sua resistência antimicrobiana é vantajosa. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) apresentaram inibição e mostraram o efeito bacteriostático da nanopartícula doadora de NO. Ensaios de crescimento bacteriano demonstraram uma redução notável na contagem bacteriana, na maior concentração da nanopartícula após 16 horas de liberação constante. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão revelou a capacidade da nanopartícula doadora de NO de perturbar a arquitetura da parede celular; resultando em edema e posterior lise celular (SANCHEZ; NOSANCHUK; FRIEDMAN, 2012).

Feridas infectadas com MRSA em um modelo murino demonstraram uma redução de 99,9% da carga bacteriana. Abscessos induzidos infectados com MRSA, tratados intralesionalmente e superficialmente com nano partículas doadoras de NO também superaram a eficácia da vancomicina; a vancomicina mostrou uma diminuição de 94% da carga microbiana enquanto nanopartículas doadoras de NO quase eliminaram a carga microbiana, 99% (SANCHEZ; NOSANCHUK; FRIEDMAN, 2012).

Como aplicação biológica de nanopartículas de entrega, temos a nanopartícula doadora de diclofenaco no processo inflamatório de uma incisão cirúrgica, a sutura cirúrgica revestida das nanopartículas liberam o anti-inflamatório sustentavelmente e o direcionam aos macrófagos ativados no processo de inflamação devido a ferida do procedimento. Isso causa melhora no efeito do fármaco e na cicatrização do ferimento (KIM et al., 2017).

Catéteres tratados com nanopartículas doadoras de NO apresentaram redução na formação de biofilme de *C. albicans in vivo*. Essas nanopartículas evitam a formação de biofilmes e efetivamente matam leveduras e hifas dentro de biofilmes maduros; elas também interferem com o crescimento de fungos e morfogênese durante a infecção (AHMADI et al., 2016).

Observou-se um amplo efeito bactericida de nanopartículas de sílica que liberam ativamente o NO, e seus subprodutos reativos diminuem a viabilidade bacteriana via peroxidação lipídica e reação com proteínas da membrana, DNA e enzimas metabólicas. A vantagem de utilizar NO sobre outros agentes antimicrobianos (por exemplo, prata e antibióticos) é as várias formas de atividade antimicrobiana do NO e a baixa toxicidade para células de mamíferos em concentrações necessárias para a ação antimicrobiana. Além disso, estudos iniciais sugerem a incapacidade das bactérias para desenvolver resistência à nanotecnologia derivada do NO. A terapêutica é evidente nos imensos esforços de pesquisa focados na concepção de veículos macromoleculares que liberam NO para aplicações biomédicas (CARPENTER et al., 2012).

Nanopartículas doadoras de NO interferem com o crescimento *in vitro* de *Candida albicans*, o NO consegue penetrar e permeabilizar a célula fungica. A quantidade de NO liberado através de nanotecnologia altera a integridade da estrutura da membrana da levedura, a ligação proteína-membrana e lipídeos. Como uma molécula lipofílica o NO pode facilmente atravessar a bicamada lipídica e atingir enzimas, RNA mensageiro, proteínas e DNA; prejudicando processos biológicos. A formação de peroxinitrito rompe a membrana celular através de peroxidação lipídica, acelerando a degradação da célula. As nanopartículas doadoras de NO são um promissor candidato ao uso em infecções cutâneas devido à sua excelente penetração tecidual e; potente e ampla atividade antimicrobiana (MACHERLA et al., 2012).

Alguns estudos apresentam nanopartículas tópicas doadoras de NO como um potencial tratamento para infecção dérmica por *Trichophyton rubrum*. NO exerce atividade fungistática direta através de dano do DNA, peroxidação lipídica e inativação enzimática, bem como a atividade indireta na atividade fagocítica de macrófagos (MORDORSKI et al., 2017).

## 2.6. Biofilme

Biofilmes microbianos foram inicialmente descritos por Antonie van Leeuwenhoek, e hoje é considerado por vários pesquisadores um fator de virulência, representando um risco para a saúde pública. A definição do termo “biofilme” foi elaborada por Costerton, Geesey e Cheng (1978), em que a maioria das bactérias cresce em uma matriz compacta de polissacarídeos aderidos à superfície em um determinado ecossistema contendo suficientes nutrientes, onde as bactérias sésseis diferem profundamente das suas formas planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A matriz polimérica dos biofilmes é denominada como substâncias poliméricas extracelulares (EPS), a qual mantém a união das bactérias na microcolônia do biofilme, sendo composta por polissacarídeos, ácidos nucleicos, e proteínas (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002).

A formação do biofilme ocorre quando uma bactéria planctônica adere a uma superfície inerte, na presença de determinadas forças de “cisalhamento” que auxiliam na persistência da comunidade microbiana em um ambiente (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990).

Os biofilmes podem se formar em dois tipos de ambientes: (1) com pouca turbulência, apresentando baixa força de tensão (cisalhamento) e podendo “quebrar” mais facilmente; ou (2) com alta turbulência, apresentando alta resistência mecânica (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Entre as forças físicas associadas à persistência das bactérias na superfície de um ambiente, destacamos as forças de van der Waals, interações estéricas, e eletrostáticas (GARRET, 2008).

Ao longo do tempo, a comunidade microbiana sésseil pode originar novas bactérias planctônicas “flutuantes”, que podem se multiplicar e dispersar para outros ambientes (COSTERTON et al., 1999). Nesse momento, tais bactérias ficam expostas aos agentes externos no ambiente, incluindo os antimicrobianos; porém, no caso do biofilme formado, a terapia convencional com antibióticos pode se tornar ineficaz contra essa comunidade microbiana (COSTERTON et al., 1999).

Um dos mecanismos de resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos pode ser explicado pela presença das EPS que atuam como uma barreira para a entrada e difusão do antibiótico na matriz do biofilme (COSTERTON et al., 1999).

Outro aspecto importante do biofilme microbiano é o processo de comunicação célula-a-célula, conhecido como “*Quorum-sensing*”, envolvendo a sinalização por pequenas moléculas produzidas pela própria bactéria, que ao atingir determinadas concentrações ativam importantes genes, com diferentes finalidades, como o controle da densidade populacional (DAVIES et al., 1998).

Um dos fatores de virulência descritos para cepas patogênicas de *S. aureus*, é a produção de biofilme, que contribui na persistência bacteriana, principalmente em ambientes hospitalares (GÖTZ, 2002), porém quando nos referimos aos casos de mastite bovina, não existem estudos demonstrando isso.

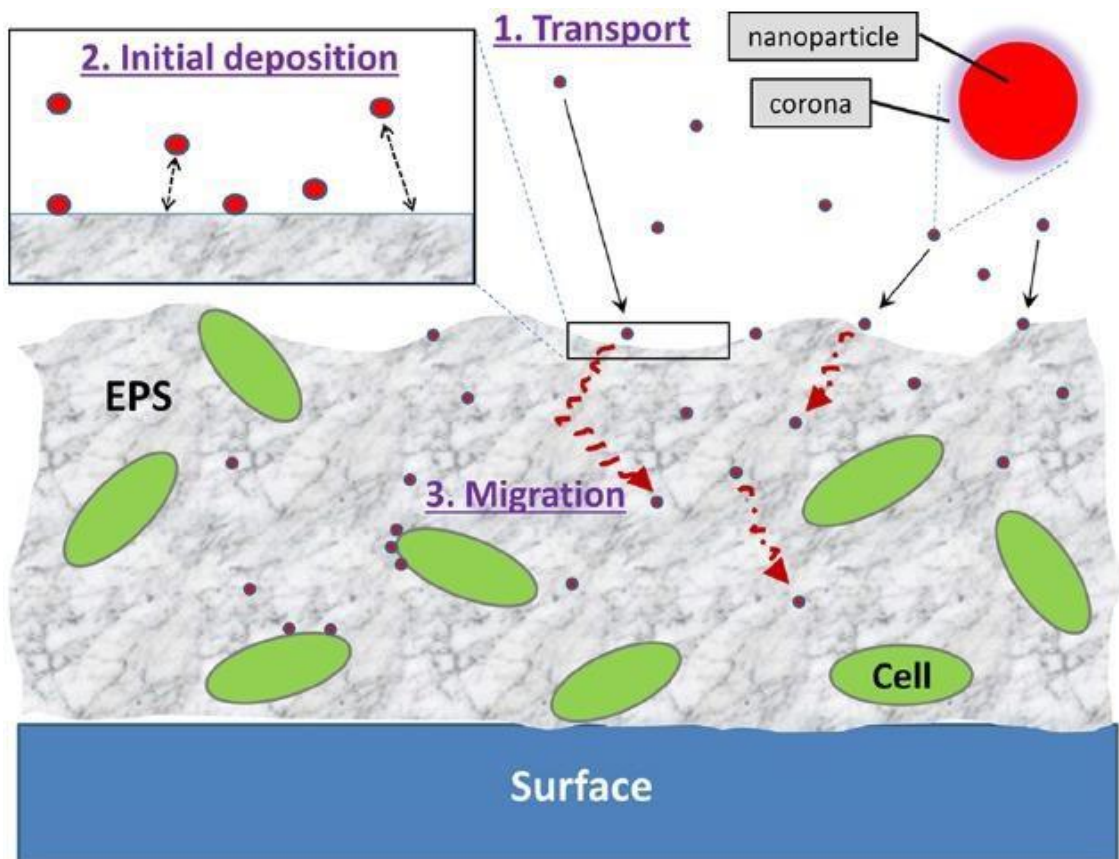
Entretanto, um estudo demonstrou que o número de isolados de *S. aureus* obtidos de fontes intra-mamárias (leite) que produziam biofilmes era maior do que quando isolados de fontes externas, sugerindo que o biofilme produzido por tais cepas bacterianas representa um fator de risco para causar infecção intra-mamária (FOX; ZADOCS; GASKINS, 2005).

Outro aspecto importante em relação às determinadas cepas bacterianas isoladas de vacas com mastite bovina, é que tais bactérias podem aderir e crescer em uma superfície de aço inoxidável de um permutador de calor em uma unidade de pasteurização de produtos lácteos (FLINT; BREME; BROOKS, 1997).

Os biofilmes bacterianos podem interagir com diferentes nanopartículas, e que isto ocorre devido à presença das EPS presentes nos biofilmes, resultando no acúmulo dessas nanopartículas nos biofilmes bacterianos (KROLL et al., 2014; NEVIUS et al., 2012).

As interações entre nanopartículas e o biofilme ocorrem através de um processo com três etapas (IKUMA; DECHO; LAU, 2015): (1) transporte das nanopartículas para a proximidade do biofilme, (2) deposição inicial das nanopartículas na superfície do biofilme, e (3) migração das nanopartículas para áreas mais profundas do biofilme (Figura 1).

**Figura 1** - Os três passos envolvidos nas interações de nanopartículas-biofilme: (1) Aproximação das nanopartículas; (2) deposição inicial; e (3) migração no biofilme (IKUMA; DECHO; LAU, 2015).



Desse modo, torna-se imprescindível eliminar ou prevenir a formação de biofilmes bacterianos, uma vez que eles são importantes fatores de risco de infecção.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M. et al. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 353-364, 2000.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H.A pilot study of freeze drying of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006.
- AHMADI, M.S. et al. Sustained Nitric Oxide-Releasing Nanoparticles Induce Cell Death in *Candida albicans* Yeast and Hyphal Cells, Preventing Biofilm Formation *In Vitro* and in a Rodent Central Venous Catheter Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 2185 – 2194, 2016.
- ARAÚJO, M.L.C.; ANDRIOLI, J.L. *Staphylococcus aureus* resistance patterns to antimicrobial and penicillinase among strains isolated from apparently lactating cows. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 60-63, 1996.
- AZEVEDO, M.A. et al. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 141 – 146, 2014.
- BALLOU, M.A. Growth and development symposium: inflammation: role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1466–1478, 2012.
- BANNERMAN, T.L. et al. Pulsed-field Gel Electrophoresis as a Replacement for Bacteriophage Typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 551-555, 1995.
- BHASME, P.C. et al. In silico characterization of putative drug targets in *Staphylococcus saprophyticus*, causing bovine mastitis. **Bioinformatics**, v. 9, p. 339–344, 2013.

- BLANCO, M. et al. Genes coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O:K:H serotypes. **Veterinary Microbiology**, v. 42, n. 2-3, p. 105-110, 1994.
- BOPP, C.A. et al. (2003). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: **Murray, P.R.; Baron, E.JO; Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A.; Tenover, R.H. (eds). Manual of Clinical Microbiology**, v. 1, 8 (ed.), p. 654-671, 2003.
- BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinay Journal**, v. 164, p. 116-128, 2002.
- CAMPOS, L.C.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.
- CARPENTER A.W. et al. Influence of Scaffold Size on Bactericidal Activity of Nitric Oxide Releasing Silica Nanoparticles. **American Chemical Society Nano**, v.5, p. 7235–7244, 2011.
- CARPENTER, A.W. et al. Dual Action Antimicrobials: Nitric Oxide Release from Quaternary Ammonium-Functionalized Silica Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v.13, p. 3334 – 3342, 2012.
- CHAFER, M. Tendências e avanços do agronegócio do leite nas Américas: produção primária. **Congresso Panamericano do Leite; Porto Alegre. Montevideú: Fepale**, v. 128, 2006.
- CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. **Biofilms**. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y, 796 pgs, 1990.
- CHOUAKE, J. et al. Nitrosoglutathione generating nitric oxide nanoparticles as an improved strategy for combating *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds. **Journal of Drugs in Dermatology**, v.11, p. 1471-1477, 2012.
- COSTA, E.O. et al. Etiologia bacteriana da mastite bovina no estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.17, p.107- 112, 1986.

- COSTA, E.O. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 3 ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, cap 42; p. 443-55, 2002.
- COSTA, E.O. Mastite: fatores de resistência. **Napgama**, v. 6, p. 24 - 26, 2003.
- COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, G.K. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p. 86-95, 1978.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-22, 1999.
- DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, n. 280, v. 5361, p. 295-8, 1998.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167–93, 2002.
- EMERICH, D.F.; THANOS, C.G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. **Biomolecular Engineering**, v. 23, p. 171-184, 2006.
- ESCHERICH, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. **Fortsch der Med**, v. 3, p. 515-522, 1885.
- FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p.1456-1459, 2006.
- FLINT, S.H; BREMER, P.J.; BROOKS J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant – description, current concerns and methods of control. **Biofouling**. V. 11:81–97, 1997.
- FOX, L.K.; ZADOKS R.N.; GASKINS C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology** v. 107, p. 295–299, 2005.

- FRIEDMAN, A. et al. Susceptibility of Gram-positive and -negative bacteria to novel nitric oxide-releasing nanoparticle technology. **Virulence**, v. 2, p. 217-222, 2011.
- FROST, M.C.; REYNOLDS, M.; MEYERHOFF, M.E. Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improve biocompatibility of blood-contacting medical devices. **Biomaterials**, v. 26, p. 1685-1693, 2005.
- GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, n. 18, p. 1049–1056, 2008.
- GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol Microbiol** v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 228-33, 2002.
- HINTHONG, W. et al. Detection and drug resistance profile of Escherichia coli from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand. **Peer Journal** v. 2017, p. 1 – 16, 2017
- HO, C.M. et al. Nitric oxide-releasing ruthenium nanoparticles. **Chemical Communications Home**, v. 47, p. 10776 – 10778, 2011.
- HOLMES, M.A.; ZADOKS, R.N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 373–382, 2011.
- HOLT, J.G. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. **Baltimore: Williams and Wilkins**, v. 75, p. 121, 1994.
- IGNARRO, L.J. **Nitric Oxide, Biology and Pathobiology**; Academic Press: San Diego, CA, 2000.
- IKUMA, K.; DECHO, A.W.; LAU, B.L.T. When nanoparticles meet biofilms – interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. **Frontiers in Microbiology** v. 6, p. 591, 2015.

- JOHNSON, J.R.; STELL, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261-72, 2000.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004
- KAPER, J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 355–6, 2005.
- KIM, H. et al. Surgical suture releasing macrophage-targeted drug-loaded nanoparticles for an enhanced anti-inflammatory effect. **Biomaterials Science**, v. 5, p. 1670 - 1677, 2017
- KLOOS, W.E. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans: **The Staphylococci in Human Disease**. New York: Churchill Livingstone, p. 113-138, 1997.
- KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 1465, 2001.
- KROLL, A. et al. Extracellular polymeric substances (EPS) of fresh water biofilms stabilize and modify CeO<sub>2</sub> and Ag nanoparticles. **PLoS ONE** v.9: p. e110709. doi:10.1371/journal.pone.0110709, 2014.
- LANGONI, H. Complexidade etiológica da mastite bovina. **Encontro de Pesquisadores em Mastites**, v. 3, p. 3-18, 1999.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- MACHERLA, C. et al. Nitric oxide releasing nanoparticles for treatment of *Candida albicans* burn infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1 – 9, 2012.
- MARTINEZ-RUIZ, A.; LAMAS, S. Two decades of new concepts in nitric oxide signaling: From the discovery of a gas messenger to the mediation of

- nonenzymatic post translational modifications. ***IUBMB Life***, v. 61, p. 91-98, 2009
- MIHU, M.R. et al. Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *Acinetobacter baumannii* wound infections. ***Virulence***, v. 1, p. 62-67, 2010.
- MORDORSKI, B. et al. Topical nitric oxide releasing nanoparticles are effective in a murine model of dermal *Trichophyton rubrum* dermatophytosis. ***Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine***, v. 13, p. 2267 – 2270, 2017.
- MURRAY, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 7 ed. **Washington: American Society for Microbiology**, p. 264-77, 1999.
- NASTI, A. et al. Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. ***Pharmaceutical Research***, v. 26, n. 8, p. 1918-1930, 2009.
- NEVIUS, B. et al. Surface- functionalization effects on uptake of fluorescent polystyrene nanoparticles by model biofilms. ***Ecotoxicology*** v. 21, p. 2205–2213.doi:10.1007/s10646-012-0975-3, 2012.
- OLIVEIRA, H.C. et al. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. ***Nitric Oxide***, v.61, p. 10-19, 2016.
- REYNOLDS, M.M.; FROST, M.C.; MEYERHOFF, M.E. Nitric oxide-releasing hydrophobic polymers: Preparation, characterization, and potential biomedical applications. ***Free Radical Biology & Medicine***, v. 37, p. 926-936, 2004.
- RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. ***Journal of Controlled Release***, v. 116, p. 1 – 27, 2006.
- SAKAI, H. et al. Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in Positive Blood Cultures by Real-Time PCR with

Two Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5739 – 5744, 2004.

SANCHEZ, D.A.; NOSANCHUK, J.; FRIEDMAN, A. The purview of nitric oxide nanoparticle therapy in infection and wound healing. **Nanomedicine** vol. 7, p. 933-936, 2012.

SCHAIRER, D.O. et al. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agentes. **Virulence**, v. 3, p. 271 – 279, 2012.

SEABRA, A.B. et al. S-nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. **Nitric Oxide**, v. 11, p. 263-272, 2004a.

SEABRA, A.B.; DURÁN, N. Nitric oxide releasing-vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry Home.**, v. 20, p. 1624-1637, 2010.

SHISHIDO, S.M.; SEABRA, A.B.; LOH, W.; DE OLIVERIA, M.G. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in pluronic F-127 gels: Potential uses for local nitric oxide release. **Biomaterials**, v. 24, p. 3543-3553, 2003.

STYLIOS, G.K.; GIANNOUDIS, P.V.; WAN, T. Application of nanotechnologies in medical practice. **International Journal of the Care of the Injured**, v. 365, p. S6-S13, 2005.

TEIXEIRA, M. et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 491-500, 2005.

TSERING, D.C.; PAL, R.; KAR, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence and Current Susceptibility Pattern in Sikkim. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, p. 9-13, 2011.

- WATER, J.J. et al. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against *Staphylococcus aureus* in infected epithelial cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 92, p. 65 – 73, 2015.
- WINN, W.C.Jr et al. Chapter 6 The Enterobacteriaceae. **Koneman`s color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 6 ed., p. 211-302, 2006.
- YU, X. et al. Preparation and characterization of mucosal adhesive and two-step drug releasing cetirizine-chitosan nanoparticle. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 600 – 609, 2017.
- ZADOKS, R.N. et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, p. 1931-1939, 2000.

#### 4. ARTIGO

Este artigo foi publicado em outubro de 2014, na revista “International Journal of Pharmaceutics” (Volume 473, páginas 20-29).

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.051



### **“Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis”**

Viviane F. Cardozo<sup>a</sup>, Cesar A.C. Lancheros<sup>a</sup>, Adélia M. Narciso<sup>b</sup>, Elaine C.S. Valereto<sup>b</sup>, Renata K.T. Kobayashi<sup>a</sup>, Amedea B. Seabra<sup>b</sup>, Gerson Nakazato<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário - CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil.

<sup>b</sup> Exact and Earth Department, Universidade Federal de São Paulo, Rua São Nicolau, 250 - CEP 09913-030, Diadema, SP, Brazil.

\* Corresponding author: Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil. Tel.: +55 (43) 3371 4396; Fax: +55 (43) 3371 4788. E-mail address: gersonnakazato@yahoo.com.br, gnakazato@uel.br (G. Nakazato).

## Abstract

Bovine mastitis is a serious veterinary disease that causes great loss to the dairy industry worldwide. It is a major infectious disease and is difficult to manage and control. Furthermore, emerging multidrug resistant bacteria that cause mastitis have complicated such management. The free radical nitric oxide (NO) is a potent antimicrobial agent. Thus, the aims of this study were to prepare and evaluate the antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* (MBSA) and *Escherichia coli* (MBEC), which were isolated from bovine mastitis. Fifteen MBSA isolates and fifteen MBEC were collected from subclinical and clinical bovine mastitis. Biocompatible polymeric particles composed of alginate/chitosan or chitosan/sodium tripolyphosphate (TPP) were prepared and used to encapsulate mercaptosuccinic acid (MSA), which is a thiol-containing molecule. Nitrosation of thiol groups of MSA-containing particles formed S-nitroso-MSA particles, which are NO donors. The NO release kinetics from the S-nitroso-MSA particles showed sustained and controlled NO release over several hours. The antibacterial activity of NO-releasing particles was evaluated by incubating the particles with an MBSA multi-resistant strain, which is responsible for bovine mastitis. The minimum inhibitory concentration for S-nitroso-MSA-alginate/chitosan particles against MBSA ranged from 125 µg/mL to 250 µg/mL. The results indicate that NO-releasing polymeric particles are an interesting approach to combating bacteria resistance in bovine mastitis treatment and prevention.

**Keywords:** Antibacterial activity; bovine mastitis; *Escherichia coli*; nitric oxid; polymeric particles; *Staphylococcus aureus*.

## Introduction

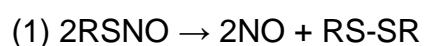
Bovine mastitis is an infection in the mammary gland and is the major illness for dairy ruminants, which has reduced milk production and it is often associated with cattle disorders such as fever as well as altered heart and/or respiratory rates and rumen motility (Soto et al., 2003; Lohuis et al., 1998). Bacteria such as *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* are the major causes of bovine mastitis (Rainard and Riolet, 2006). Dairy cow mastitis is a disease with considerable economic importance. Throughout the course of a lactation, the incidence rate for mastitis may reach 100% in dairy herds with averages at 30–50% in many countries. In many countries and continents, including Europe, North and South America and New Zealand, *S. aureus* is among the most common causes of clinical and subclinical mastitis in dairy cattle (Holmes and Zadoks, 2011). The economic loss associated with clinical mastitis in the United States has been estimated at approximately US\$179 per mastitis case. Such loss is calculated from the reduced milk production, discarded milk, increased cull rates, pharmacologic costs, and increased labor costs (Ballou, 2012).

Further, emerging multidrug resistant bacteria that cause mastitis have complicated its management, and such resistance has complicated its prevention and treatment (Bhasme et al., 2013). Thus, using new antibacterials is desirable for controlling bovine mastitis. Certain compounds, such as violacein, have been tested against resistant bacteria with bactericidal effects; however, this antibiotic showed host toxicity (Cazoto et al., 2011).

Recent studies have indicated that nitric oxide (NO) is a key mediator for inflammatory responses caused by bovine mastitis (Piotrowska-Tomala et al., 2012). Indeed, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and staphylococcal enterotoxin C were observed in mammary gland secretions infected with *S. aureus*, which indicates that NO-related species (NOx) are important for animal immune responses against bacteria (Komine et al., 2004). The free radical NO is a key molecule in the immunological system, which is important for the natural host defense against invading pathogens such as bacteria (Martínez-Ruiz et al., 2011; Seabra et al., 2010). NO is enzymatically synthesized by several types of cells such as macrophage and neutrophils. Furthermore, given its small size and lipophilicity, when it is secreted by

immune cells, NO readily diffuses across cells membranes and causes oxidative and nitrosative damage to invading pathogens (Schairer et al., 2012; Han et al., 2009). NO toxicity is based on its concentration. At low concentrations (nanomolar range), NO is a signaling molecule; in contrast, at high concentrations (micromolar-millimolar range), NO is a potent toxic agent, which can bind vital biomolecules in a pathogen, such as DNA, proteins and lipids (Schairer et al., 2012). Animal cells produce low concentrations of NO for regulatory functions, and NO acts as an intracellular signal. However, animal cells also synthesize high concentrations of NO (>1  $\mu\text{mol/L}$ ) through the action of the enzyme inducible NO synthase (iNOS). Indeed, host iNOS is a key component of the innate immune system. Therefore, NO is a mean of animal defense against microbes, and the use of exogenous NO donors for antimicrobial therapies is similar to the action of endogenous iNOS, i.e. production of high amounts of NO for longer periods of time to combat pathogens (Schairer et al., 2012). In addition, several papers described that the topical application of NO donors has been effective in inducing a local immune host response with minimal side effects (Mowbray et al., 2009).

As a free radical, certain molecules in biological media, such as hemoglobin, readily react with NO inactivate this molecule (Cooper, 1999). Thus, S-nitrosothiols (RSNOs) are important molecules that act as spontaneous NO carriers and donors to preserve NO bioavailability (Seabra et al., 2004, 2007, 2010). RSNOs are molecules with a thiol (SH) group covalently bound to NO; thus, they are NO donors that act through homolytic S-N bond cleavage and free NO release, which is indicated in Eq. (1) (De Oliveira et al., 2002; Shishido et al., 2003; Seabra and de Oliveira, 2004; Schairer et al., 2012).



In addition, RSNOs can transfer NO to other thiols in biomolecules, such as cysteine-containing proteins, through an S-transnitrosation reaction (Schairer et al., 2012). Important RSNOs, such as S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitrosopolyesters, have antibacterial activities against gram-negative and gram-positive pathogens (Schairer et al., 2012; Seabra et al., 2010).

NO is an important player in natural host defenses against microbes; however, as a free radical, the therapeutic applications for NO are limited by a lack of effective transport and delivery vehicles. Thus, there has been increasing interest in developing NO-releasing materials in a safe, low-cost, controlled and sustained manner for antimicrobial applications (Cabrales, 2011; Carpenter and Schoenfisch, 2012; Seabra and Duran 2010; Seabra et al., 2010). Polymeric nanoparticles for biomedical applications, particularly delivery vehicles for bactericidal agents, have been the center of intense investigations over the last few years (Seabra and Durán, 2012; Seabra et al., 2012; Mihiu et al., 2010).

We have already reported a preparation technique for NO-releasing polymeric nanoparticles composed of alginate/chitosan (Marcato et al., 2011, 2013). Indeed, alginate/chitosan systems have been widely used at micro and macro scales for biomedical applications because they have low toxicity and are biocompatible and biodegradable (Marcato et al., 2011, 2013; Douglas et al., 2006). In particular, chitosan is a versatility material that can be used to form fibers, films, gels, sponges, beads or nano/micro particles (Dutta et al., 2011). Chitosan is a cationically charged polymer derived from crustacean exoskeletons and can disrupt cellular membranes and damage cell walls (Mihiu et al., 2010). Therefore, chitosan has antimicrobial activities against many pathogenic microorganisms such as fungi as well as gram-positive and gram-negative bacteria (Dutta et al., 2011; Berezin et al., 2012). Classically, chitosan/sodium tripolyphosphate (TPP) nanoparticles are the most studied system for drug delivery. This system was first introduced by Calvo et al. (1997). More recently, hybrid systems comprised by alginate and chitosan were reported (Goycoolea et al., 2009; Marcato et al., 2013). This hybrid system has been reported to improve some physical properties, such as the particle stability in biological media, pharmacological performance in comparison with conventional particles (i.e. comprised solely by chitosan/TPP) (Goycoolea et al., 2009).

In this work, biodegradable and biocompatible polymeric particles composed of alginate/chitosan or chitosan/sodium tripolyphosphate (TPP) were prepared and used to encapsulate mercaptosuccinic acid (MSA), which is a thiol-containing molecule. Nitrosation of thiol groups in MSA-containing particles led yielded S-nitroso MSA particles, which act as NO carriers and donors. The kinetics of NO release from S-nitroso MSA particles were monitored for 12 h at a physiological temperature. The

antibacterial activity of NO-releasing particles was evaluated by incubating the particles with a *S. aureus* multi-resistant strain responsible for bovine mastitis. The results indicate that NO-releasing polymeric particles could be used to combat bacterial resistance as well as treat and prevent bovine mastitis.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Materials**

The chitosan (105 kDa/~81% acetylation) was from Polymar, Ciência e Nutrição S/A, Fortaleza, CE, Brazil. The alginate (~250 cps), mercaptosuccinic acid (MSA), sodium nitrite, sodium tripolyphosphate (TPP), acetic acid, 5'5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 were from Sigma, St. Louis, MO, USA and used as received. The culture media were from Difco<sup>®</sup>. The disks used for the agar diffusion technique were from Laborclin<sup>®</sup>. The aqueous solutions were prepared using analytical grade water from a Millipore Milli-Q Gradient filtration system.

### **2.2. Bacterial strains**

*S.aureus* (15) (MBSA) and *E.coli* (15) (MBEC) isolates were from subclinical and clinical bovine mastitis, respectively. The field isolates were from farms in Central São Paulo State with a history of chronic subclinical and clinical bovine mastitis problems (Cabral et al., 2004; Ribeiro et al., 2006). An antimicrobial resistance profile was determined using a disk-diffusion test (Cazoto et al., 2011) in accordance with the Clinical Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2012). The strains were stored at -80 °C in a 2.5 mol/L glycerol solution.

### **2.3. Synthesis of MSA-containing polymeric particles**

In this work, four types of polymeric particles were prepared: (i) alginate/chitosan (0.75 ratio) without MSA (control), (ii) alginate/chitosan (0.75 ratio) with 4.0 mg/mL of MSA (26.5 mmol/L), (iii) chitosan-TPP particles without MSA (control 2), and (iv) chitosan-TPP particles with 80 mg/mL MSA (0.53 mol/L).

Alginate/chitosan particles with and without MSA were prepared using the ionic gelation method, as previously described (Marcato et al., 2013). Initially, 0.266 g of chitosan was dissolved in 10 mL of 1% acetic acid. After 24 h of magnetic stirring, 10 mL of deionized water was added to the chitosan solution followed by homogenization at room temperature for 24 h. One milliliter of the chitosan solution was added dropwise into a 200 mL aqueous solution with alginate (0.01 g) at pH 4.0 through magnetic stirring. This method was used to prepare alginate/chitosan particles at the ratio 0.75 (control particles). For MSA-containing alginate/chitosan particles, MSA (16 g) was added to the chitosan solution (prepared in 1% acetic acid) followed by homogenization. Through magnetic stirring at room temperature, 1 mL of the chitosan–MSA solution was added to the alginate solution at pH 4.0. This was used to prepare aqueous solutions with alginate/chitosan particles and 26.5 mmol/L of MSA (which corresponds to 4.0 mg/mL). Alginate/chitosan particles with 41.5  $\mu\text{mol/L}$  of MSA were also prepared by adding a corresponding quantity of MSA to the polymeric suspension.

Similarly, chitosan particles with and without MSA were prepared through ionotropic gelation using chitosan and sodium tripolyphosphate (TPP), as described by Tripathy et al. (2012). Briefly, 0.1 g of chitosan was dissolved in 100 mL of 1% acetic acid. Through magnetic stirring at room temperature, 5 mL of the TPP (0.6 mg/mL) solution was added dropwise into 15 mL of a 1 mg/mL chitosan solution. The final mixture was stirred to prepare an aqueous solution with chitosan/TPP particles. MSA (0.53 mol/L, 80 mg/mL)-containing particles were prepared by adding 8.0 g of MSA into a chitosan solution.

#### **2.4. Scanning electron microscopy (SEM)**

The particles were characterized using scanning electron microscopy (SEM). Twenty microliters of MSA-polymeric particles was dropped on aluminum stubs, sputter-coated for 2 min in a high-vacuum (Balt-Tec MED 020, Liechtenstein) gold sputter-coating unit and were examined using a Jeol JSM T300 (Tokyo, Japan) electron microscope.

## 2.5. The average size and size distribution for polymeric particles in an aqueous medium

The average size and size distribution for MSA-polymeric particles with alginate/chitosan or chitosan/TPP were measured using photon correlation spectroscopy (PCS) (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Co.) at 25 °C in polystyrene cuvettes with a 10 mm path length. The zeta potential was measured in capillary cells with a 10 mm path length using the Nano ZS Zetasizer. The measurements were performed in a 0.1 mmol/L sodium chloride solution.

## 2.6. MSA encapsulation efficiency in polymeric particles

The encapsulation efficiencies of MSA in alginate/chitosan and in chitosan/TPP particles were measured by the UV–vis method, as already described (Marcato et al., 2013). Briefly, free MSA was separated from polymeric nanoparticles by ultracentrifugation. A volume of 500  $\mu\text{L}$  of polymeric nanoparticle solutions was filtered in a Microcon centrifugal filter device containing ultrafiltration membranes (MWCO 10,000, Millipore). The amount of free MSA in the ultrafiltrates was measured by titration with a thiol-reacting 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), based on the absorbance band at 412 nm ( $\epsilon = 14.15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) of the 2-nitro-5-thiobenzoate anion, which is generated in the reaction of MSA with DTNB (Marcato et al., 2013; Seabra et al., 2010). A volume of 0.5 mL of ultrafiltrated MSA was added to 1.2 mL of 0.7  $\text{mmol L}^{-1}$  of DTNB in PBS buffer (pH 7.4), after 5 min of incubation the absorbance at 412 nm was measured in a UV–vis Agilent 8453 spectrophotometer. The measurements were performed in triplicates. The percentage of encapsulated MSA was determined by equation:

$$\text{Encapsulation efficiency (EE\%)} = \left[ \frac{(\text{total MAS} - \text{free MAS})}{\text{total MSA}} \right] \times 100$$

## 2.7. Nitrosation of MSA-containing polymeric particles

Thiol groups in MSA-containing polymeric particles were nitrosated by adding equimolar quantities of sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) directly into a polymeric aqueous dispersion (pH 4.0). The final solution was homogenized with magnetic stirring for 30 min and protected from light. S-nitroso (S-NO)-polymeric particle formation was characterized by the S-NO group absorption bands at either 336 nm ( $\epsilon = 922 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) or 545 nm ( $\epsilon = 18 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) using a UV-vis spectrophotometer (Agilent, model 8453, Palo Alto) (Seabra et al., 2005).

## 2.8. NO release from polymeric particles at a physiological temperature

The kinetics for NO release from S-nitroso-MSA in alginate/chitosan or chitosan/TPP particles in an aqueous solution were determined by monitoring the spectral changes at 336 or 545 nm, which are associated with S-N bond cleavage and free NO release (Seabra and de Oliveira, 2004). Kinetic data were collected at these wavelengths at 30 min intervals at 37 °C for 12 h by dissolving the polymeric particles in an aqueous solution. The final S-nitroso-MSA concentrations were diluted to 1.4 or 3.0 mmol/L, which correspond to 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The quantity of NO released was directly calculated based on the quantity of S-nitroso-MSA decomposed, as previously described (Shishido et al., 2003). Each point on the kinetic curves is the average from three independent experiments; the error bars indicated the standard error for the mean. The initial rates of NO release through S-nitroso-MSA decomposition were determined through linear regression of the curve slopes, which was previously described (Shishido et al., 2003).

## 2.9. Cell viability assay

The HEP-2 cell line was cultured in a 96-well culture plate at  $2.5 \times 10^5$  cells/well and incubated for 24 h. When the cells were confluent, the non-adherent cells were removed by washing with sterile 0.01 mol/L phosphate buffer saline (PBS). The media with different MSA-alginate/chitosan and S-nitroso-MSA-alginate/chitosan particles concentrations (1–2000  $\mu\text{g/mL}$ ) were added to each well with the cells, and the plates were incubated for 24 h. The control cells were only

cultured in the growth medium. Cell viability was determined using the dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma–Aldrich, USA) method in accordance with the manufacturer's recommendation. The compound concentration that inhibited cell viability by 50% (IC50) was determined through a regression analysis. The 50% cytotoxicity concentration (CC50/24 h) and selectivity index (SI) were calculated using the equation  $SI = CC50/IC50$ .

#### **2.10. The antibiosis effect from NO-releasing polymeric particles evaluated using the agar diffusion technique**

The experiment was performed using three replicates for S-nitroso-MSA in alginate/chitosan particles at two quantities (40 and 800 µg). The MSA-alginate/chitosan particles were the negative controls (particles without NO and only diluent). The antibiotic effect from the samples on the MBSA strains was evaluated using Mueller Hinton agar plates. MBSA suspensions with  $10^8$  colony-forming units (CFU)/mL were grown to log phase, and the diffusion disks were treated with the samples. The plates were incubated at 35 °C for 24 h, and the inhibition halo diameter size was evaluated (mm). The experiment was repeated three times, and the antibiosis effect was determined by measuring the inhibited halo size around the disk.

#### **2.11. Determining the minimal inhibitory concentration (MIC)**

The MICs were determined using micro-dilution assays in 96-well plates, as suggested by the CLSI (2012). Briefly, single bacterial culture colonies were grown in Mueller-Hinton agar media, diluted in a saline solution and adjusted to 0.5 using the MacFarland scale, which corresponds to  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL. Next, the bacterial suspensions were diluted in Mueller-Hinton broth and plated in 96-well plates at  $5.0 \times 10^5$  CFU/well. Finally, different S-nitroso-MSA-alginate/chitosan or S-nitroso-MSA-chitosan/TPP particle (NO-releasing) concentrations were added to each well to determine the MIC values. As negative controls, MSA-alginate/chitosan, MSA-chitosan/TPP particles, free S-nitroso-MSA (non-encapsulated), and only diluent were added to the plates at equal concentrations. The plates were incubated at 37 °C for 18 h, and the optical density values at 600 nm were determined using a Bio-Rad Microplate Reader Model 3550.

## 2.12. Kill–growth curve

To quantify the effects from the NO-releasing polymeric particles (at the final concentrations 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which corresponds to 1.4 and 3.0  $\text{mmol}/\text{L}$ , respectively) on the bacterial growth, time–response growth curves were generated (CLSI, 1999). Briefly, a single colony forming unit (CFU) for each MBSA strain was diluted in Mueller-Hinton broth and grown for 18 h at 37 °C and 200 rpm with constant stirring. Next, each culture was adjusted to 0.5 using the MacFarland scale and inoculated at  $10^6$  CFU/mL in 2 mL of Mueller-Hinton broth. Each strain culture was divided into two new cultures at 1 mL each. One culture group received the NO-releasing polymeric particles (S-nitroso-MSA-alginate/chitosan or S-nitroso-MSA-chitosan/TPP particles), and the control groups received the vehicle particles (MSA-alginate/chitosan or MSA-chitosan/TPP particles), as well as, only bacteria (growth control). The bacterial cultures were incubated at 37 °C with constant stirring (200 rpm). At different times, aliquots of the broth were collected, serially diluted in the saline solution, plated on Mueller-Hinton agar media and grown for 18 h at 37 °C to determine the total CFU for each culture. Based on the previous tests, additional curves were generated under the same conditions as described above by introducing a second dose after incubating for 12 h and with the same nanoparticle concentration. The second dose of S-nitroso-MSA particles was applied in order to enhance the efficiency of S-nitroso-MSA-particles.

## 2.13. Statistical analysis

The data were analyzed using a one-way ANOVA; the difference among the means was determined using the Tukey post-hoc test ( $p < 0.05$ ). The statistical analyses were performed using BioEstat version 5.0 software.

### 3 Results and discussion

#### 3.1. Synthesis and characterization of MSA-containing polymeric particles

To explore the role of NO in antimicrobial activity, this unstable molecule must be delivered to an application site in a controlled and non-toxic manner. Thus, biodegradable and biocompatible polymeric particles are interesting platforms for drug delivery (Seabra and Duran, 2012). Alginate and chitosan are natural polysaccharides that are broadly used in pharmacological applications (Vinsova and Vavrikova 2011; Zohri et al., 2013). Chitosan is generated through chitin deacetylation; furthermore, because it includes free amino groups, it has a positive charge and can therefore react with negatively charged molecules, such as DNA (Tripathy et al., 2012). Moreover, chitosan may have antimicrobial properties (Wiarachai et al., 2012), and thus, chitosan with an NO donor might potentiate antibacterial activity in the particles. Therefore, NO-releasing polymeric particles may be important for biomedical applications, such as antimicrobial activity (Seabra and Durán, 2010).

In this work, alginate/chitosan and chitosan/TPP particles were prepared as vehicles for NO-releasing systems. Fig. 1(A–C) shows scanning electron microscopy (SEM) images for the 0.75 ratio of alginate/chitosan particles without MSA (Fig. 1A) and at two different MSA concentrations (Fig. 1B,C). As previously reported, the non-spherical particle shapes may be due to the drying process used for the SEM analyses (Marcato et al., 2013). Fig. 1A,B shows images of well-dispersed particles on a nano scale, whereas Fig. 1C shows such particles on a micro scale. Clearly, adding MSA at low levels (41.5  $\mu\text{mol/L}$ ) to alginate/chitosan particles (Fig. 1B) did not affect the size and shape of pure alginate/chitosan particles (Fig. 1A). In contrast, adding MSA at high concentrations (26.5  $\text{mmol/L}$ ) to alginate/chitosan particles (Fig. 1C) generated particles on a micro scale. Probably, alginate/chitosan complexes with different morphologies are formed in this case, and further studies are required to clarify this issue.

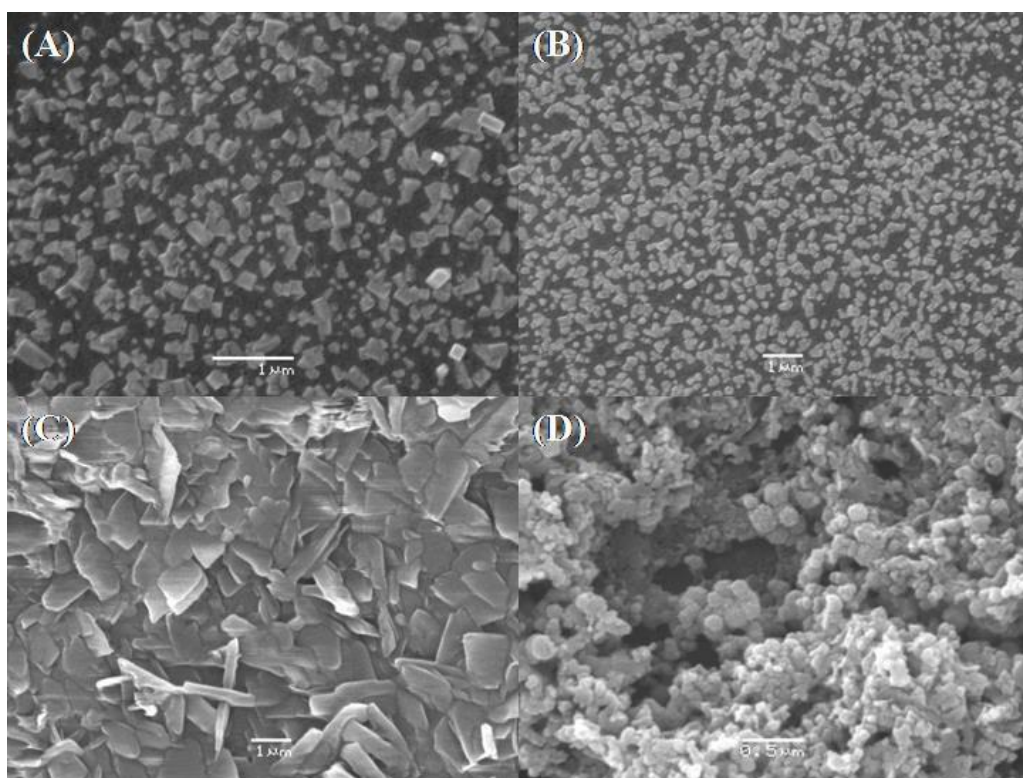


Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) images for (A) 0.75 alginate/chitosan particles, (B) 0.75 ratio alginate/chitosan particles with MSA (41.5  $\mu\text{mol/L}$ ), (C) 0.75 ratio alginate/chitosan particles with MSA (26.5 mmol/L), and (D) chitosan/TPP particles with MSA (0.53 mol/L).

The alginate/chitosan particles were spontaneously formed through ionic gelation at room temperature (Douglas et al., 2006; Marcato et al., 2013). Polyionic complex formation in alginate/chitosan is dictated by electrostatic interactions between negatively charged alginate and positively charged chitosan (Douglas et al., 2006).

Fig. 1 D shows an SEM image for chitosan/TPP particles with MSA (0.53 mol/L). Spherical particles on a nano scale with good polydispersity were observed. Chitosan/TPP nanoparticles with MSA were successfully prepared through ionic gelation. Cationic chitosan readily reacts with multivalent counter ions, such as TPP, to yield a network structure (Tripathy et al., 2012).

In this work, both alginate/chitosan and chitosan/TPP particles with MSA were prepared through ionic gelation process upon mixing aqueous phases at room temperature. This process is due to the positively charged chitosan chains that

undergo a liquid–gel transition upon contact with negative alginate chains or TPP polyanions, which forms beads (Tripathy et al., 2012; Douglas et al., 2006; Marcato et al., 2013). This process is spontaneous under mild conditions and yields polymeric particles without high temperatures, organic solvents, surfactants or sonication (Wiarachai et al., 2012).

In an aqueous solution, particle size was established through dynamic light scattering (DLS). Alginate/chitosan particles at the ratio 0.75 had, on average, a 375 nm hydrodynamic size, 0.29 polydispersity index (PDI) and +16 mV zeta potential, which is consistent with our previous report (Marcato et al., 2013). The positive potential indicates the presence of chitosan chains on the particle surfaces. Adding MSA (41.5  $\mu\text{mol/L}$ ) to alginate/chitosan generated particles with, on average, a 377 nm hydrodynamic size, 0.31 polydispersity index (PDI) and +17 mV zeta potential. Thus, it is likely that MSA addition to the nanoparticles at this concentration does not change the particle size and distribution. However, adding higher MSA concentrations (26.5 mmol/L) increased the average hydrodynamic size for alginate/chitosan to ca. 750 nm. This result indicates that higher MSA concentrations with alginate/chitosan generates particles with micro-size sizes, as demonstrated through SEM (Fig. 1C).

The measurements of encapsulation efficiency of MSA in polymeric particles were carried out by quantitative reaction of ultrafiltrate isolated free MSA with DTNB, a thiol specific reagent, as previous described (Marcato et al., 2013). DTNB reacts rapidly with thiols forming  $\text{TNB}^{2-}$ , which has a characteristic absorption band at 412 nm (Riddles et al., 1983). Encapsulation efficiencies for MSA (at concentrations 41.5  $\mu\text{mol/L}$  and 26.5 mmol/L) in alginate/chitosan were found to be  $94 \pm 8\%$  and  $89 \pm 3\%$ , respectively. These results reveal a high encapsulation efficiency of the small molecule MSA into alginate/chitosan particles.

Fig. 2 shows a representative particle size distribution for chitosan/TPP particles with MSA (0.53 mol/L) in an aqueous solution. The chitosan/TPP/MSA nanoparticle size was in the range 25–400 nm with an average diameter at 277 nm and 0.35 polydispersity index (PDI). Our data are consistent with the previous reports, wherein the chitosan/TPP particles had average diameters at 150–350 nm (Wiarachai et al., 2012; Tripathy et al., 2012). Moreover, chitosan/TPP nanoparticles

with MSA (0.53 mol/L) or without MSA are primarily characterized by a positive zeta potential (+6 mV and +10 mV, respectively) due to a positively charged amine group on the nanoparticle surface. The positive surface charge on alginate/chitosan or chitosan/TPP particles facilitates a direct interaction between the polymeric particles and the negatively charged bacteria membranes. Encapsulation efficiency of MSA (0.53 mol/L) in chitosan/TPP particles were found to be  $86.8 \pm 5.3\%$ . High levels of MSA were encapsulated into both alginate/chitosan and chitosan/TPP particles, highlighting the success of particles preparation.

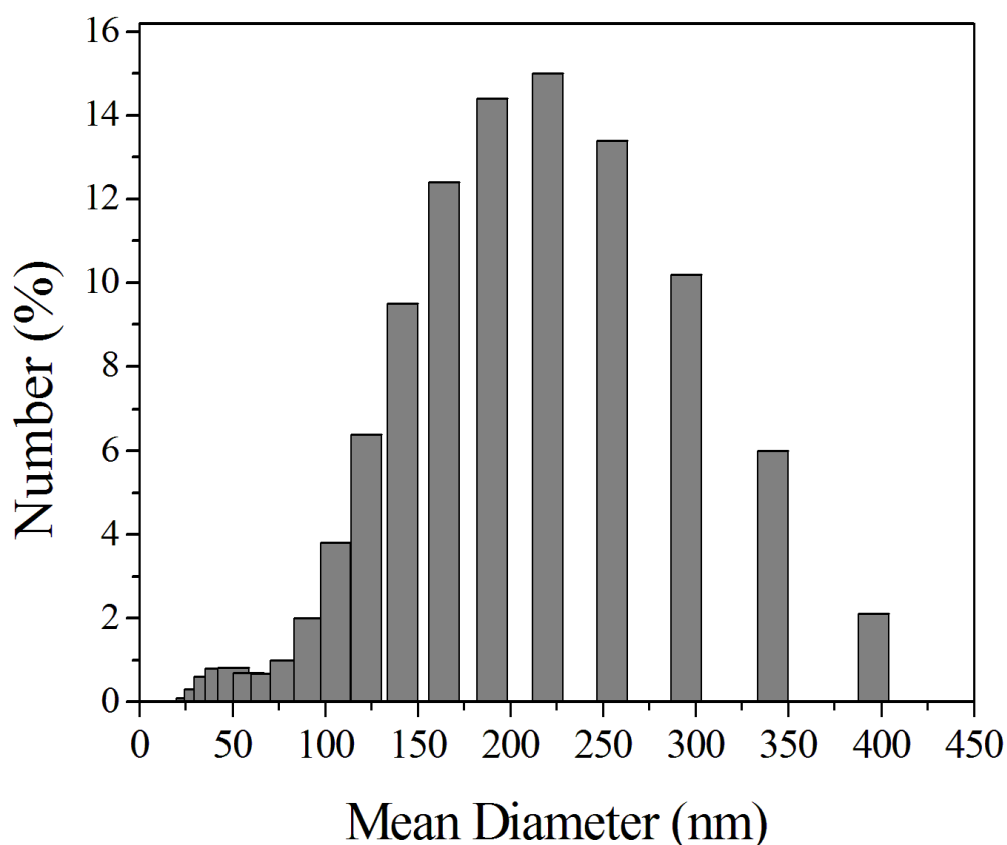
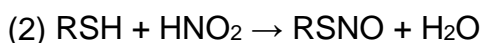


Fig. 2. Representative particle size distribution for chitosan/TPP particles with MSA (0.53 mol/L) in an aqueous solution.

### 3.2. Nitrosation of MSA-containing polymeric particles

Thiol groups (SH) of MSA-containing alginate/chitosan or chitosan/TPP particles were nitrosated, leading to the formation of S-nitroso-MSA-particles. Nitrosation was performed in aqueous solution by adding sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ), which formed nitrous acid ( $\text{HNO}_2$ ), the nitrosating agent, in an acidic aqueous solution, which is shown in Eq. (2).



RSH corresponds to MSA, and RSNO corresponds to S-nitroso-MSA. To avoid excess unreacted reagent, equimolar quantities of sodium nitrite (compared to MSA) were added to the polymeric particle solutions.

The MSA nitrosation yielded S-nitroso-MSA, which was confirmed through detecting two characteristic absorption bands for S-nitroso (S-NO) groups in the UV (at 336 nm,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $\epsilon = 922 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) and visible region of the spectrum (at 545 nm,  $n_{\text{N}} \rightarrow \pi^*$ ,  $\epsilon = 18 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ). Both the bands are associated with electronic transitions for the S-NO group (De Oliveira et al., 2002; Seabra et al., 2005). Thus, S-nitroso-MSA in alginate/chitosan or chitosan/TPP particles were successfully prepared.

### 3.3. NO release profile from polymeric particles in an aqueous solution at physiological temperature

The kinetics for NO release from S-nitroso-MSA 1.4 or 3.0 mmol/L (which correspond to 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) in alginate/chitosan or chitosan/TPP aqueous solutions were monitored through the spectral changes at 336 or 545 nm. The decrease in these absorption bands corresponds to S-nitroso-MSA decomposition with free NO release, which has been reported for other S-nitrosothiols (RSNOs) (Seabra et al., 2004). This calculation is based on the RSNO absorption band decay, such as for S-nitroso MSA, at 336 or 545 nm, which can be solely associated with homolytic cleavage of the S-N bond and NO release in

accordance with Eq. (1) (Shishido et al., 2003). RSNO decomposition, such as for S-nitroso MSA, releases free NO and mercaptosuccinic acid dimers that are bound through a sulfur bridge (RS–SR), as previously described (Seabra et al., 2010; Seabra and de Oliveira, 2004; Molina et al., 2013).

Fig. 3 shows kinetic curves for thermal NO release from S-nitroso MSA at the concentrations 1.4 and 3.0 mmol/L (250 and 500 µg/mL, respectively) for alginate/chitosan or chitosan/TPP particles dissolved in an aqueous solution at 37 °C and protected from light, as indicated in the figure. Clearly, NO is spontaneously released from S-nitroso MSA-containing polymeric particles in an aqueous solution at a physiological temperature. In all cases, the NO release profile sharply increases in the first ca. 4 h then continues to increase at progressively lower rates after the initial burst; the release reaches a plateau after ca. 10 h under the experimental conditions. The quantity of NO released from S-nitroso MSA polymeric particles in an aqueous solution was found to be in the millimolar range. This NO release profile might be useful for biomedical applications, such as antibacterial activity. Moreover, Fig. 3 shows that greater NO quantities were released from S-nitroso MSA for the chitosan/TPP particles compared with the alginate/chitosan particles, for the same S-nitroso MSA concentration. Fig. 4 compares the magnitudes for the initial rates of NO release, which were calculated from the curves in Fig. 3. The initial NO release rate for S-nitroso MSA in alginate/chitosan particles at 1.4 mmol/L was  $0.16 \pm 0.01 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 4(i)), whereas the initial rate increased 2-fold ( $0.34 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (Fig. 4(ii)) when the S-nitroso MSA concentration was doubled (3.0 mmol/L). This result is consistent with the autocatalytic effect on NO release from RSNOs, which was previously reported (De Oliveira et al., 2002). For chitosan/TPP particles, the initial NO release rate from S-nitroso MSA at 1.4 mmol/L was  $0.22 \pm 0.02 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 4(iii)), whereas the value was  $0.79 \pm 0.07 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 4(iv)) for the MSA concentration at 3.0 mmol/L. Figs. 3 and 4 show that the rate and extent of NO released from chitosan/TPP particles were greater compared with alginate/chitosan particles, at the same concentration. This result indicates that alginate delays the rate of NO release from the particles. This effect might be due to a stronger interaction between S-nitroso-MSA and alginate in the particle. NO release from polymer particles depends on various mechanisms, such as desorption, diffusion, particle erosion or a combination of such factors,

including desorption from the surface; diffusion through the pores or a wall; and hydropolymeric structure disintegration, dissolution or erosion (Cruz et al., 2006). A previous study demonstrated that the release mechanism for NO from alginate/chitosan particles was consistent with a classic Fickian diffusion model (Marcato et al., 2013). It must be noted that as chitosan and alginate are biodegradable polymers, the rates of NO release from these polymeric particles in the biological system may differ from the profile shown in Fig. 3.

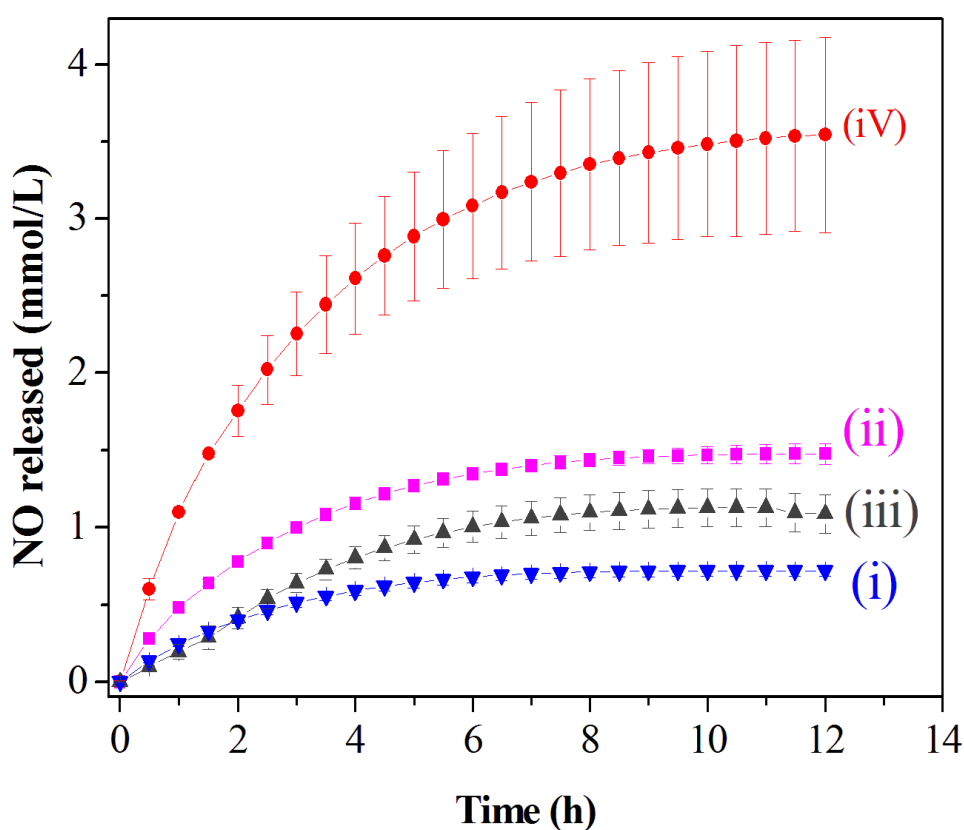


Fig. 3. NO release profile for S-nitroso-MSA-polymeric particles in aqueous solutions in the dark at 37 °C for 12 h. Alginate/chitosan particles with S-nitroso MSA at 1.4 mmol/L (250  $\mu$ g/mL) (i) and 3.0 mmol/L (500  $\mu$ g/mL) (ii). Chitosan/TPP particles with S-nitroso MSA at 1.4 mmol/L (250  $\mu$ g/mL) (iii) and 3.0 mmol/L (500  $\mu$ g/mL) (iv).

(iv).

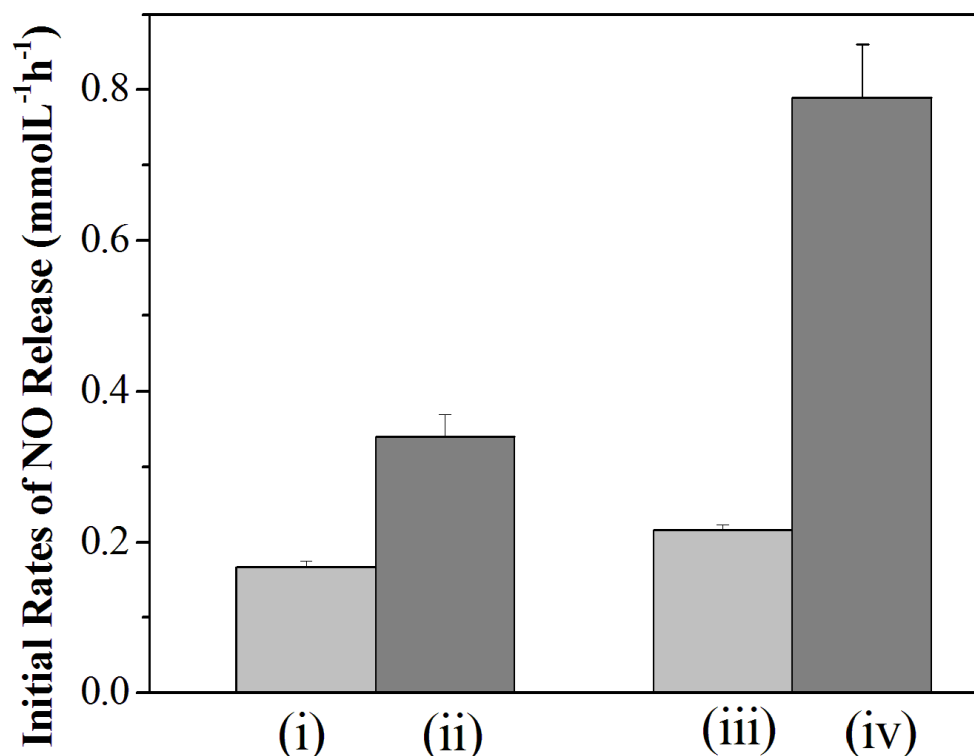


Fig. 4. Initial NO release rates for S-nitroso MSA-polymeric particles in aqueous solutions in the dark at 37 °C for 12 h. Alginate/chitosan particles with S-nitroso MSA at 250 µg/mL (1.4 mmol/L) (i) and 500 µg/mL (3.0 mmol/L) (ii). Chitosan/TPP particles with S-nitroso MSA at 250 µg/mL (1.4 mmol/L) (iii) and 500 µg/mL (3.0 mmol/L) (iv).

To mimic the conditions during the bacteria assays, NO release was measured without light such that NO production was limited to thermal S-nitroso MSA decomposition and not photolytic cleavage of RSNO (Shishido et al., 2003; Seabra et al., 2004). Our data show that NO in the millimolar range is spontaneously released from polymeric particles in an aqueous solution at a physiological temperature for long periods of time (*ca.* 10 h). Hetrick et al. (2009) reported antibacterial effects from NO-releasing silica nanoparticles, wherein the NO release profile was at a maximum in a few minutes. The authors stated that rapid NO release from silica nanoparticles generated a greater immediate NO concentration in the solution, which may optimize

the antibacterial effects from NO (Hetrick et al., 2009). Similarly, NO-release from a silane hydrogel platform was used as antibacterial agent against methicillin-resistant *S. aureus*. Amperometric analyses demonstrated immediate NO release from the silane hydrogel after 70 min in an aqueous solution (Martinez et al., 2009). Mihiu et al. (2010) reported an antibacterial effect from NO-releasing chitosan-based nanoparticles against *Acinetobacter baumannii* (Ab). Kinetic measurements demonstrated sustained NO release for up to ca. 24 h after an initial peak (Mihiu et al., 2010). The kinetic profile for NO release reported herein is typical for S-nitrosothiol- or NONOate-based nanomaterials with an initial NO burst in the range 0.3–5 h; the NO is fully released after 12–24 h (Carpenter et al., 2012; Cabrales et al., 2010; Privett et al., 2012; Sun et al., 2012).

### **3.4. Cell viability assay**

It was impossible to determine the 50% cytotoxic concentration for HEp-2 cells incubated with MSA-alginate/chitosan particles because 84% of the cells were viable even with the highest concentration tested (2000 µg/mL), which was demonstrated using the MTT assay. The CC50/24 h and SI (selectivity index) for S-nitroso-MSA-alginate/chitosan particles were 640 µg/mL and 2.56, respectively. It must be noted that the concentrations of the S-nitroso-MSA used in antibiosis assays were lower than the cytotoxic concentration (CC50%).

### **3.5. Diffusion disc-mediated antibiotic treatments against MRSA strains**

As an initial screen to evaluate antimicrobial activity for the NO-releasing polymeric particles, the diameters were measured for the zone of inhibition generated by MBSA and MBEC exposure to MSA-alginate/chitosan and S-nitroso-MSA-alginate/chitosan particles. The results show that the zones were the same size for MBEC exposed to both particles (approximately 6–7 mm). In contrast, for MBSA, the S-nitroso-MSA-alginate/chitosan inhibition zone (approximately 9–10 mm) was larger compared with the MSA-alginate/chitosan particles (without NO). These results show that NO-releasing polymeric particles inhibited *S. aureus* growth, however this material was not efficient for *E. coli*. This apparent discrepancy can be understood by considering that *S.aureus* and *E.coli* were isolated from subclinical and clinical bovine mastites, respectively, and gram-negative bacteria are considered more

resistant to some antibiotics. Although some reports describe the efficacy of NO-releasing vehicles against *E. coli*, in this present work we did not observe this effect. Probably, these *E. coli* isolates have resistance mechanisms against NO and therefore counteract nitrosative stress. *E. coli* strains displayed the lowest susceptibility to NO-nanoparticles whereas gram-positive bacteria strains were the most susceptible. The bacterial species evaluated were susceptible to NO-nanoparticles in the following order: *Streptococcus pyogenes* > *Enterococcus faecalis* > *Klebsiella pneumoniae* > *Pseudomonas aeruginosa* > *E. coli*. NO-nanoparticles displayed broad antimicrobial activity against gram-positive and -negative bacteria, including strains resistant to multiple antibacterial agents (Friedman et al., 2011). Further studies are undertaking to clarify this point.

### 3.6. Minimal inhibitory concentration (MIC)

For the MBSA strains, the MICs were 2000 µg/mL and in the range 125–250 µg/mL for MSA-alginate/chitosan and S-nitroso-MSA-alginate/chitosan particles, respectively. For the MBEC strains, the MICs were higher than 2000 µg/mL for MSA-alginate/chitosan and S-nitroso-MSA alginate/chitosan particles, which indicates that such particles did not produce an antibacterial effect for *E. coli*. For the MBSA and MBEC strains, the MICs were found to be higher than 1000 µg/mL for free S-nitroso-MSA (non-encapsulated), indicating that the encapsulation of the NO donor in polymeric nanoparticles is important for obtaining the antibacterial activity. The encapsulation of S-nitroso-MSA into the polymeric nanoparticles led to a sustained and controlled NO release, which have a potent antimicrobial effect.

These compounds do not have breakpoints because they are new antimicrobials. Therefore, four strains (MBSA 04, MBSA 19, MBEC 01, and MBEC 10) were selected based on our initial results for the growth and viability curves.

### 3.7. Growth and viability curves

Fig. 5 shows the antibacterial effects from NO-releasing polymeric particles against MBSA 19 after incubating for 24 h. Fig. 5A,B shows the colony forming units (CFUs) for the MBSA 19 strain exposed to S-nitroso-MSA alginate/chitosan particles, MSA-alginate/chitosan particles, at the concentrations 250 and 500 µg/mL, and only the bacteria in the culture medium (control), as indicated in the figures. The arrows

indicate that the samples were applied to the bacterial culture medium in a second dose. A second dose of S-nitroso-MSA particles was applied in order to enhance the decrease of the number of CFU, as can be observed in the Fig. 5. Similarly, Fig. 5C,D shows the MBSA 19 strain CFU, which was incubated with S-nitroso-MSA-chitosan/TPP, MSA-chitosan/TPP at the concentrations 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and only the bacteria in the culture medium (control), as indicated in the figures.

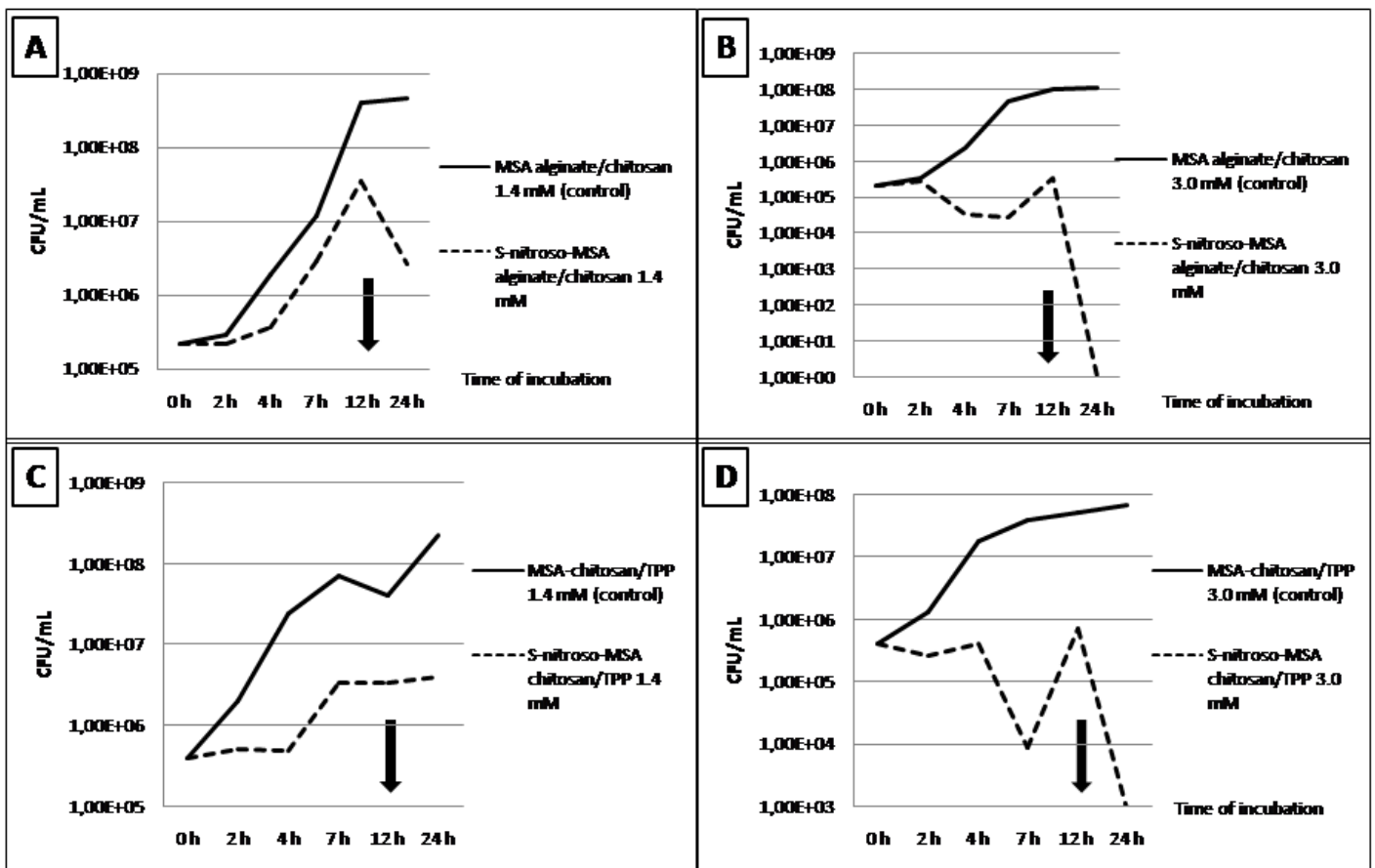


Fig. 5. Time-kill curves for the *Staphylococcus aureus* bovine mastitis strain 19 (MBSA 19) exposed to (A) and (B) S-nitroso-MSA alginate/chitosan particles and MSA-alginate/chitosan particles (control) at 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively; and (C) and (D) S-nitroso-MSA chitosan/TPP particles and MSA-chitosan/TPP particles at 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Notes – straight line, control; dashed line, NO-releasing particles; and arrows, application of a second dose at the same concentration. Negative control, only bacteria in the culture medium.

Fig. 5 shows that MSA-containing polymeric particles slightly decreased the number of CFU, in comparison with the control group. This can be explained as chitosan is known to have antimicrobial properties. In the case of MSA-containing polymeric particles, the number of CFUs increased with the incubation time, which was expected. For the S-nitroso-MSA particles, the number of CFUs slightly decreased over time during the first few hours. However, this number increased after exposition for ca. 7 h. Thus, the S-nitroso-MSA polymeric particles (at the same concentration) were added to the bacteria medium in a second dose after 12 h, which is indicated by the arrows in Fig. 5. The second dose of either S-nitroso-MSA alginate/chitosan or S-nitroso-MSA chitosan/TPP particles decreased the number of CFUs. In particular, Fig. 5A shows that adding a second dose of S-nitroso-MSA alginate/chitosan (at the concentration 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) the number of CFU was 100-fold lower compared with MSA-alginate/chitosan ( $p < 0.05$ ). Similarly, Fig. 5(B) shows that the number of CFU, after incubating for 4 and 7 h, were 10-fold and 1000-fold lower compared with the MSA-alginate/chitosan particles ( $p < 0.05$ ). Moreover, upon the addition of a second dose after 12 h of incubation, the number of CFU drastically decreased (Fig. 5B).

Fig. 5C shows that the number of CFUs was 100-fold lower when MBSA 19 was incubated with S-nitroso-MSA-chitosan/TPP particles (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) compared with MSA-chitosan/TPP ( $p < 0.05$ ). However, after adding the second dose of NO-releasing particle at the same concentration, the number of CFUs did not decrease over time (Fig. 5C). Fig. 5D shows that the number of CFUs after 7 h of incubation with S-nitroso-MSA-chitosan/TPP (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were ca. 1000-fold lower compared with MSA-containing particles ( $p < 0.05$ ). Moreover, adding a second dose of S-nitroso-MSA-alginate/chitosan (at same concentration) eliminated the bacteria (Fig. 5D).

Our results demonstrate that NO-releasing polymeric particles are an alternative approach to fighting multi-resistant *S. aureus*. Such NO-releasing particles efficiently produce antibacterial effects during first few hours of application (up to ca. 7 h), which is demonstrated in Fig. 5. Thereafter, the number of CFUs increased; hence, a second dose of the NO-releasing particles were necessary. This result is consistent with the kinetic profile for NO release using both polymeric particles (Fig. 3). As indicated in Fig. 3, both particles release NO in an initial burst during the first

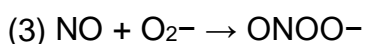
few hours; thus, more antibacterial activity using such materials is expected for this time-frame. Fig. 3 presents the NO release profile from polymeric nanoparticles at the two tested concentrations. It can be observed that there is an initial burst of NO release, in the first hours, followed by a slow release, until a plateau is reached. As expected, higher concentration of S-nitroso-MSA reaches the plateau in longer time-frame, compared with lower concentration of the NO donor. The plateau is reached between 5–11 h, depending on the concentration (Fig. 3). This data corresponds to the observed antibacterial activity, in which the CFU started to increase after ca. 7 h of incubation (Fig. 5), indicating the need of a second dose of the NO donor.

Although the kinetics were performed at the same nanoparticles and S-nitroso-MSA concentrations, and same temperature of the biological experiment (bacteria incubation), caution must be taken to directly correlate the NO release profile and the biological effect (antibacterial activity). In the biological medium, S-nitroso-MSA might have direct reactions with biomolecules, leading to the different effects.

Due to the mucoadhesive property of alginate/chitosan and high levels of NO released, NO-releasing nanoparticles are claimed to be topically applied directed to the infected mammary gland area, where NO released would have locally antibacterial effects (Seabra and Duran, 2012). The antimicrobial resistance profiles for *S. aureus* isolates illustrate a global problem that demands an intense search for new drugs and alternative strategies to increase antibacterial therapeutic success. Notably, the antibacterial effects observed herein were produced by bacterial strains from clinical and subclinical bovine mastitides at different clinical stages with certain levels of antimicrobial resistance that complicates the disease treatment. Penicillin and its derivatives are recommended for treating bovine mastitis caused by gram-positive pathogens, and regularly monitoring beta-lactamase production in *S. aureus* is recommended for herds with endemic mastitis (De Oliveira et al., 2000). However, over the last few decades, the number of *S. aureus* isolates resistant to penicillin has increased globally. For instance, in the United States, more than 70% of isolates from mastitis are penicillin-resistant, while in Brazil and Ireland, this index is ca. 85% (De Oliveira et al., 2000). Moreover, multiple drug resistance to streptomycin, sulfamethoxazole, ampicillin, or tetracycline for coliform mastitis strains has been reported (Bengtsson et al., 2009). In this work, the *S. aureus* isolates MBSA 13 and MBSA 19 displayed intermediary resistance to erythromycin, while

twelve of the fifteen *S. aureus* isolates analyzed (80%) were resistant to penicillin. The mastitis bovine *E. coli* strains were resistant to NO-releasing polymeric particles (data not shown), which demonstrates that such bacteria have defenses against NO, but *S. aureus* does not.

Several studies have described antimicrobial effects from NO (Seabra et al., 2010; Martínez-Ruiz et al., 2011). The mechanism NO uses for its antibacterial activity reportedly involves forming reactive nitrogen and oxygen species (Martínez-Ruiz et al., 2011). NO readily reacts with superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), which is a by-product from bacteria respiration and forms the unstable oxidant peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), as shown in Eq. (3). NO toxicity more likely results from a diffusion-limited reaction between NO with superoxide, which produces the powerful and toxic oxidant peroxynitrite (Cabrales, 2011).



Administering exogenous NO at concentrations greater than 1  $\mu\text{mol/L}$  reversibly inhibits cytochromo-c oxidase, which may transiently increase superoxide leakage from the electron transport chain (Cabrales, 2011). Peroxynitrite has greater cytotoxic potential compared with NO or  $O_2^{\cdot-}$  alone. Once formed,  $ONOO^-$  reacts with several biomolecules, such as DNA, lipids and proteins (Martínez-Ruiz et al., 2011). As a potent oxidant agent, peroxynitrite promotes tyrosine residue nitration and sulfhydryl oxidation for important proteins (Martínez-Ruiz et al., 2011; Radi et al., 1991). Moreover, peroxynitrite may also alter calcium homeostasis and promote mitochondrial permeability at the transition pore, which is a mitochondrial signal for cell death (Radi et al., 2002). Notably, NO's antimicrobial activity depends on its concentration. For NO concentrations greater than 1  $\mu\text{mol/L}$ , oxidative and nitrosative damage has been observed (DNA deamination, inhibited enzymes, and lipid peroxidation) (Schairer et al., 2012; Sun et al., 2012). In addition to peroxynitrite, NO reactions with oxygen or reactive oxygen species may also form additional oxidative/nitrosative species, such as nitrogen dioxide, dinitrogen trioxide and

dinitrogen tetroxide (Carpenter et al., 2012). All such reactive species have potent antimicrobial effects (Privett et al., 2012; Sun et al., 2012).

Free NO and RSNOs may yield antimicrobial activity, such as with S-nitroso-MSA, an NO donor. RSNOs can directly react with the DNA structure, which inhibits DNA repair and increases genotoxic agent production, such as hydrogen peroxide (Schairer et al., 2012). RSNOs can react with sulfhydryl groups in biomolecules, such as proteins, through the bimolecular reaction transnitrosation by donating an NO<sup>+</sup> to the sulfhydryl group (Schairer et al., 2012). This reaction mediates toxicity against microbes (Schairer et al., 2012). Evidence suggests that NO or RSNOs may be involved in a signaling pathway for bacteria (Cabrales, 2011). Therefore, the antibacterial effect observed herein may be attributed to either free NO, which is released from the particles, or an S-nitroso-MSA reaction with pathogenic biomolecules.

Endogenously generated NO is directly related to bovine mastite infection (Rainard and Riololet, 2006). During infection, inducible nitric oxide synthase (iNOS) is overexpressed (MacMicking et al., 1997), which produces elevated NO concentrations, and NO reacts with oxygen/superoxide and yields nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), and peroxynitrite. In fact, the NO<sub>x</sub> concentration in milk from clinically affected cows was 2-fold higher compared with normal animals (Osman et al., 2010). Moreover, NO release from milk leucocytes was observed upon stimulation by bacterial products, such as LPS or staphylococcal enterotoxin (Bouchard et al., 1999), and bovine macrophages secrete high quantities of NO upon stimulation with gram-positive bacteria (Jungi et al., 1999). Evidence suggests that xanthine oxidase in milk fat globules catalyzes NO production from nitrite, which can generate peroxynitrite (Rainard and Riololet, 2006). In fact, bovine milk (rich in xanthine oxidase) is bacteriostatic to *E. coli* when nitrite is added (Hancock et al., 2002). Therefore, iNOS induction in mammary tissue and the increased NO concentrations mastitic milk suggest that NO is important role for mastitis pathophysiology. Consequently, herein, exogenous NO from S-nitroso MSA-polymeric particles was incubated with multi-resistant bacteria that cause bovine mastitis to mimic this endogenous animal defense.

The application of exogenous NO donors might be an alternative for antibacterial activity against bacteria resistant to traditional antibiotics. As intercellular messenger, NO is a nonspecific host defense against intracellular pathogens and bacteria (Cabrales, 2011). Bacteria are unable to develop a resistance to exogenous NO because its toxicity is based on multiple mechanisms (Privett et al., 2012). Due to its hydrophobicity and small size, NO readily diffuses across bacterial membranes and initiates several nitrosative and oxidative reactions. In this context, bacteria resistance to NO is hindered based on the diverse NO antimicrobial mechanisms. Multiple, simultaneous bacterial mutations are necessary to resist the NO antimicrobial activity (Privett et al., 2012). Thus, NO-releasing polymeric particles are cheap, safe, and have antimicrobial activity for treating and preventing bovine mastitis to which bacteria are unlikely to develop resistance.

#### **4. Conclusions**

In this work, NO-releasing polymeric particles composed of alginate/chitosan or chitosan/TPP were prepared. The particles had hydrodynamic size in the range 270–375 nm and good dispersity. Thiol groups in MSA-containing polymeric particles were nitrosated and formed S-nitroso-MSA particles, which are spontaneous NO donors. The NO release profiles for polymeric particles were monitored for 12 h in an aqueous solution. NO release though an initial burst was observed and correlated with antibacterial activity against multi-resistant *S. aureus* bovine mastitis. The results suggest that NO-releasing polymeric particles might be used to combat bacteria in treating and preventing bovine mastitis.

#### **Acknowledgements**

Support from FAPESP (Proc. 2012/17053-7; 2013/13096-6; 2013/07132-0), CNPq (Proc. 310209/2010-2). Thanks are also due to Dr. Nelson Durán (Unicamp) for the use of laboratory facilities and to Marcio Garcia Ribeiro (UNESP-Botucatu) for providing the bacterial strains.

## References

- Ballou, M.A., 2012. Growth and development symposium: inflammation: role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 90, 1466–1478.
- Bengtsson, B., Unnerstad, H.E., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M., Waller, K.P., 2009. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 136, 142–149.
- Berezin, A.S., Lomkova, E.A., Shorik, Y.A., 2012. Chitosan conjugates with biologically active compounds: desing strategies, properties, and targeted drug delivery. *Russ. Chem. Bull.* 61, 781–795.
- Bhasme, P.C., Mahantesh, M.K., Rajeshwari, D.S., Rohit, B.K., Basappa, B.K., 2013. In silico characterization of putative drug targets in *Staphylococcus saprophyticus*, causing bovine mastitis. *Bioinformation* 9, 339–344.
- Borges, S., Silva, J., Teixeira, P., 2012. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at diferente pHs. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 101, 3, 677-682.
- Bouchard, L., Blais, S., Desrosiers, C., Zhao, X., Lacasse, P., 1999. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *J. Dairy Sci.* 82, 2574– 2581.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 1999. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents*. Approved Guideline M26-A. CLSI, Wayne, PA, USA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. Approved Standard, M07-A8, 8th ed. CLSI, Wayne, PA, USA.

- Cabral, K.G., Lammler, C., Zschock, M., Langoni, H., de Sá, M.E., Victória, C., Da Silva, A., 2004. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50, 901–909.
- Cabrales, P., Han, G., Roche, C., Nacharaju, P., Friedman, A.J., Friedman, J.M., 2010. Sustained release nitric oxide from long-lived circulating nanoparticles. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 530–538.
- Cabrales, P., 2011. Nanoengineering bactericidal nitric oxide therapies. *Virulence* 2, 185–187.
- Calvo, P., Reuman-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 125–132.
- Carpenter, A.W., Schoenfisch, M.H., 2012. Nitric oxide release: part II: therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* 41, 3742–3752.
- Carpenter, A.W., Worley, B.V., Slomber, D.L., Schoenfisch, M.H., 2012. Dual action antimicrobials: nitric oxide release from quaternary ammonium-functionalized silica nanoparticles. *Biomacromolecules* 13, 3334–3342.
- Cazoto, L.L., Martins, D., Ribeiro, M.G., Duran, N., Nakazato, G., 2011. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Antibiot.* 64, 395–397.
- Cooper, C.E., 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 290–309.
- Cruz, L., Soares, L.U., Costa, T.D., Mezzalana, G., da Silveira, N.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2006. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 313, 198–205.

- De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aarestrup, F.M., 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and United States. *J. Dairy Sci.* 83, 855–862.
- De Oliveira, M.G., Shishido, S.M., Seabra, A.B., Morgon, N.H., 2002. Thermal stability of primary S-nitrosothiols: roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J. Phys. Chem.* 106, 8963–8970.
- Douglas, K.L., Piccirillo, C.A., Tabrizian, M., 2006. Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. *J. Control Release* 115, 354–361.
- Dutta, J., Tripathi, S., Dutta, P.K., 2011. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan, and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Sci. Technol. Int.* 18, 3–34.
- Friedman, A., Blecher, K., Sanchez, D., Tuckman-Vermon, C., Gialanella, P., Friedman, J.M., Martinez, L.R., Nosanchuk, J.D., 2011. Susceptibility of gram-positive and -negative bacteria to novel nitric oxide-releasing nanoparticle technology. *Virulence* 2, 217–221.
- Goycoolea, F.M., Lollo, G., Reuman-López, C., Quaglia, F., Alonso, M.A., 2009. Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules* 10, 1736–1743.
- Han, G., Martinez, L.R., Mihu, M.R., Friedman, A.J., Friedman, J.M., Nosanchuk, J.D., 2009. Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *Staphylococcus aureus* abscesses in a murine model of infection. *PLoS One* 4, e7804 doi:[http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007804](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007804).
- Hancock, J.T., Salisbury, V., Ovejero-Boglione, M.C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R., Harrison, R., 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3308–3310.

- Hetrick, E.M., Shin, J.H., Paul, H.S., Schoenfisch, M.H., 2009. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials* 30, 2782–2789.
- Holmes, M.A., Zadoks, R.N., 2011. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 373–382.
- Jungi, T.W., Valentin-Weigand, P., Brcic, M., 1999. Differential induction of NO synthesis by gram-positive and gram-negative bacteria and their components in bovine monocyte derived macrophages. *Microb. Pathog.* 27, 43–53.
- Komine, K., Kuroishi, T., Komine, Y., Watanabe, K., Kobayashi, J., Yamaguchi, T., Kamata, S., Kumagai, K., 2004. Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on Staphylococcal enterotoxin C-stimulated bovine mammary gland cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 203–210.
- Lohuis, J.A., Van Leeuwen, W., Verheijden, J.H., Van Miert, A.S., Brand, A., 1998. Effect of dexamethasone on experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J. Dairy Sci.* 71, 2782–2789.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350.
- Marcato, P.D., Adami, L.F., Melo, O.S., Duran, N., Seabra, A.B., 2011. Glutathione and S-nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles: cytotoxicity. *J. Phys. Conf. Ser.* 304, 012045.
- Marcato, P.D., Adami, L.F., Barbosa, R.M., Melo, P.S., Ferreira, I.R., Duran, N., Seabra, A. B., 2013. Development of a sustained-release system for nitric oxide delivery using alginate/chitosan nanoparticles. *Curr. Nanosci.* 9, 1–7.
- Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S., Santiago, L., 2011. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 17–29.

- Martinez, L.R., Han, G., Chacko, M., Mihu, M.R., Jacobson, M., Gialanella, P., Friedman, A.J., Nsanchuk, J.D., Friendman, J.M., 2009. Antimicrobial and healing efficacy of sustained release nitric oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* skin infection. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2463–2469.
- Mihu, M.R., Sandkovsky, U., Han, G., Friedman, J.M., Nosanchuk, J.D., Martinez, L.R., 2010. Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *Acinetobacter baumannii* wound infections. *Virulence* 1, 62–67.
- Molina, M.M., Seabra, A.B., de Oliveira, M.G., Itri, R., Haddad, P.S., 2013. Nitric oxide donor superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 746–751.
- Mowbray, M., McLintock, S., Weerakoon, R., Lomatschinsk, N., Jones, S., Rossi, A.G., Weller, RB, 2009. Enzyme independent NO stores in human skin: quantification and influence of UV radiation. *J. Invest. Dermatol.* 129, 834–842.
- Osman, K.M., Hassan, H.M., Ibrahim, I.M., Mikhail, M.M.S., 2010. The impact of staphylococcal mastitis on the level of milk IL-6, lysozyme and nitric oxide. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 85–93.
- Piotrowska-Tomala, K.K., Siemieniuch, M.J., Szóstek, A.Z., Korzekwa, A.J., Woclawek- Potocka, I., Galvão, A.M., Okuda, K., Skarzynski, D.J., 2012. Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland epithelial cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 278– 288.
- Privett, B.J., Broadnax, A.D., Bauman, S.J., Riccio, D.A., Schoenfisch, M.H., 2012. Examination of bacterial resistance to exogenous nitric oxide. *Nitric Oxide* 26, 169–173.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266, 4244–4250.

- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., Castro, L., 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1451–1464.
- Rainard, P., Rioleet, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37, 369–400.
- Ribeiro, M.G., Costa, E.O., Leite, D.S., Langoni, H., Garino Júnior, F., Victória, C., Listoni, F.J.P., 2006. Fatores de virulência em linhagens de *E. coli* isoladas de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 58, 724–731.
- Riddles, P.W., Blakeley, R.L., Zerner, B., 1983. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 91, 49–60.
- Schairer, D.O., Chouake, J.S., Nosanchuk, J.D., Friedman, A.J., 2012. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence* 3, 271–279.
- Seabra, A.B., Durán, N., 2010. Nitric oxide releasing-vehicles for biomedical applications. *J. Mat. Chem.* 20, 1624–1637.
- Seabra, A.B., Duran, N., 2012. Nanotechnology allied to nitric oxide release materials for dermatological applications. *Curr. Nanosci.* 8, 520–525.
- Seabra, A.B., de Oliveira, M.G., 2004. Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blended films for local nitric oxide release. *Biomaterials* 25, 3773–3782.
- Seabra, A.B., Fitzpatric, A., Paul, J., de Oliveira, M.G., Weller, R., 2004. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *Br. J. Dermatol.* 151, 977–983.
- Seabra, A.B., da Silva, R., de Oliveira, M.G., 2005. Polynitrosated polyesters: preparation, characterization, and potential use for topical nitric oxide release. *Biomacromolecules* 6, 2512–2520.
- Seabra, A.B., Pankotai, E., Fecher, M., Somlai, A., Kiss, L., Biro, L., Szabo, C., Kollai, M., de Oliveira, M.G., Lacza, Z., 2007. S-nitrosoglutathione-containing

hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Dermatol.* 156, 814–818.

Seabra, A.B., Martins, D.M., da Silva, R., Simões, M.M.S.G., Brocchi, M., de Oliveira, M. G., 2010. Antibacterial nitric oxide polyester for the coating of blood-contacting artificial materials. *Artif. Organs* 34, 204–214.

Seabra, A.B., Marcato, P.D., de Paula, L.B., Duran, N., 2012. New strategy for controlled release of nitric oxide. *J. Nano Res.* 20, 61–67.

Shishido, S.M., Seabra, A.B., Loh, W., de Oliveira, M.G., 2003. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in pluronic F-127 gels: potential uses for local nitric oxide release. *Biomaterials* 24, 3543–3553.

Soto, P., Natzke, R.P., Hansen, P.J., 2003. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2a, and the nitric oxide generator, sodium nitroprussidedihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50, 263–272.

Sun, B., Slomberg, D.L., Chudasama, S.L., Lu, Y., Schoenfisch, M.H., 2012. Nitric oxide-releasing dendrimers as antibacterial agents. *Biomacromolecules* 13, 3343–3354.

Tripathy, S., Das, S., Charkraborty, S.P., Sahu, S.K., Pramanik, P., Roy, S., 2012. Synthesis, characterization of chitosan–tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: a dose and duration dependent approach. *Int. J. Pharm.* 434, 292–305.

Vinsova, J., Vavrikova, E., 2011. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities – a review. *Curr. Pharm. Design* 17, 3596–3607.

- Wiarachai, O., Thongchul, N., Kiatkamjornwong, S., Hoven, V.P., 2012. Surface-quaternized chitosan particles as an alternative and effective organic antibacterial material. *Colloid Surf. B* 92, 121–129.
- Zohri, M., Alavidjeh, M.S., Mirdamadi, S.S., Behmadi, H., Nasr, S.M.H., Gonbaki, S.E., Ardestani, M.S., Arabzadeh, A.J., 2013. *J. Food Saf.* 33, 40–49.

## 5. CONCLUSÃO

As nanopartículas poliméricas doadoras de NO são eficazes na atividade antibacteriana, e apresentam um grande potencial no tratamento e prevenção de mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*.

O biofilme bacteriano pode ser evitado e eliminado pelas nanopartículas poliméricas liberadoras de NO.

## ANEXO

# Atividade anti-biofilme

## Metodologia

A atividade anti-biofilme foi avaliada em microplacas de 96 poços com superfície de poliestireno (TPP®), segundo a metodologia de Borges e colaboradores (2012).

### 1- Cepas bacterianas

Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* de vacas com mastite bovina (MBSA) subclínica cepa 4, e MBSA subclínica cepa 19, foram utilizadas no estudo. As bactérias foram mantidas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid®) com 20% de glicerol (Merck®), a uma temperatura de – 80 °C, até o momento do uso.

### 2- Partículas poliméricas

As partículas poliméricas de alginato/quitosana com S-nitroso e ácido mercaptosuccínico (MSA) com liberação de óxido nítrico (NO) foram utilizadas nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, as mesmas do estudo anterior (Cardozo et al., 2014).

### 3- Biofilme bacteriano

As células bacterianas foram crescidas em meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB) (BD™), a uma temperatura de 37 °C, por 18 h. A cultura bacteriana foi centrifugada (2.000 g durante 5 min). O precipitado bacteriano foi lavado com tampão fosfato-salino (PBS) (0,15 M e pH 7,2) esterilizado; e ressuspenso em TSB para a concentração de  $1,0 \times 10^8$ . Duas concentrações de nanopartículas (250 e 500 µg / mL) foram testadas.

### 4- Atividade na formação do biofilme

Para análise da formação de biofilme foram transferidos 20 µL da suspensão de células e 180 µL de TSB com as diferentes concentrações de

nanopartículas poliméricas. As placas de 96 poços foram incubadas por 24 h, a uma temperatura de 37 °C.

#### **5- Atividade em biofilme maduro**

Para a análise do efeito das nanopartículas poliméricas sobre o biofilme maduro, foram adicionados em cada poço da placa 20 µL da suspensão celular e 180 µL de TSB. Após 24 h de formação do biofilme, a uma temperatura de 37 °C, o meio foi aspirado de cada poço, e posteriormente lavado com PBS. Posteriormente 200 µL de TSB contendo as nanopartículas poliméricas nas concentrações de 250 e 500 µg/mL foram adicionados aos poços, e a placa foi incubada por mais 24 h, a uma temperatura de 37 °C.

#### **6- Avaliação da inibição do biofilme (leitura)**

A concentração inibitória mínima dos biofilmes em % de inibição foi calculada comparando poços controle livre de nanopartículas poliméricas. Uma alíquota de 200 µL de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-Carboxanilide) - menadiona (0.5 mg/mL de XTT e menadiona a 1 mM) foi adicionada a cada poço, as placas foram então incubadas no escuro a 37 °C por 90 minutos, depois foi medida a densidade óptica em 490 nm com um leitor de microplacas (Synergy HT, Biotek). Os ensaios foram realizados em triplicata.

## **Resultados**

Os resultados da atividade anti-biofilme das nanopartículas poliméricas liberadoras de NO encontram-se na tabela 1.

A atividade anti-biofilme das nanopartículas liberadoras de NO foi maior para os biofilmes maduros quando comparada com a sua formação, para todas as cepas testadas. E a concentração de 500 µg/mL foi mais eficiente em todas as situações (tipo de biofilme, tratamento e cepas bacterianas).

Em relação ao tratamento (com e sem liberação de NO), não houve diferença na atividade anti-biofilme, com exceção da cepa MBSA 19, na formação do biofilme, em que a presença do NO inibiu mais a formação do biofilme bacteriano.

Tabela 1- Atividade das nanopartículas poliméricas liberadoras de NO na formação e em biofilmes maduros de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Cepas bacterianas	Tratamento	Concentração das nanopartículas* (µg/mL)	Formação de biofilme (% de inibição)	Biofilme maduro (% de inibição)
<b>S. aureus</b>	NP	250	55,97	90,90
		500	65,35	100,00
<b>ATCC 25923</b>	NP+NO	250	50,13	100,00
		500	58,01	100,00
<b>MBSA 4</b>	NP	250	53,90	99,27
		500	62,97	100,00
	NP+NO	250	41,22	52,35
		500	66,92	100,00
<b>MBSA 19</b>	NP	250	29,30	100,00
		500	41,70	100,00
	NP+NO	250	40,53	58,58
		500	72,46	121,93

\* Nanopartículas de alginato e quitosana com S-nitroso-MAS (ácido mercaptosuccínico) liberadoras de NO.

MBSA: Cepa de *Staphylococcus aureus* oriunda de mastite bovina subclínica.

## Discussão

Há vários anos, os biofilmes bacterianos representam um grande problema para o tratamento de infecções, sendo que bactérias crescidas em biofilmes são mais tolerantes aos antimicrobianos convencionais do que as bactérias “livres” ou “isoladas” (Stewart e Costerton, 2001). Essas nanopartículas com sua liberação de

NO mostraram-se eficientes contra cepas de *S. aureus* que também produzem biofilmes, motivo do qual foi verificado a eficiência desses compostos na formação e em biofilmes maduros.

As duas concentrações de nanopartículas testadas (250 e 500 µg/mL) para a atividade anti-biofilme foram as mesmas que apresentaram atividade estafilocócica contra as mesmas cepas isoladas de vacas com mastite subclínica em um estudo anterior (Cardozo et al., 2014). Ambas as concentrações inibiram a formação de biofilme para as cepas testadas, assim com maior inibição para a concentração de 500 µg/mL de nanopartículas, como era de se esperar. O mesmo fenômeno ocorreu para o biofilme maduro, também esperado, porém, com maior eficiência (% de inibição) na atividade anti-biofilme, demonstrando apresentar maior atividade para biofilmes maduros.

Para ambas as concentrações de nanopartículas, não houve diferença entre a atividade nos tratamentos (só nanopartículas, e com liberação de NO), para a formação e sobre biofilme maduro, demonstrando que as nanopartículas que apresentaram atividade anti-biofilme, sem a interferência direta do NO.

Hoje, é conhecido que biofilmes do ambiente interagem com nanopartículas, e que isto ocorre devido à presença das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), resultando no acúmulo dessas nanopartículas nos biofilmes bacterianos (Nevius et al., 2012; Kroll et al., 2014). Assim, os resultados do estudo sugerem que as nanopartículas interagiram com as EPS ao longo do tempo (24 horas) principalmente com as EPS pré-formadas nos biofilmes maduros, uma vez que o NO é instável ao longo do tempo, como demonstrado nas curvas de tempo e morte do estudo anterior (Cardozo et al., 2014).

Um estudo realizado por Privett e colaboradores (2012) demonstrou que diferentes espécies bacterianas, incluindo *S. aureus* não apresentaram resistência ao NO após as exposições sistemáticas ao NO em concentrações sub-inibitórias, sugerindo a grande dificuldade no surgimento de resistência ao NO. Entretanto, as cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina que foram sensíveis a presença das nanopartículas liberadoras de NO no estudo anterior (Cardozo et al., 2014), não apresentaram o mesmo efeito inibitório sobre os biofilmes, reforçando que as nanopartículas foram as substâncias diferenciais na atividade anti-biofilme.

Outros estudos utilizando diferentes nanopartículas polimérica liberadoras de NO demonstram atividade anti-biofilme contra diferentes espécies bacterianas, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (Craven et al, 2016). Entretanto, não foi reportada tal atividade anti-biofilme para as mesmas nanopartículas poliméricas utilizadas em nosso estudo, e nem para isolados de mastite bovina.

Nossos resultados demonstraram que essas nanopartículas com liberação de NO inibiram a formação, como também atuaram de forma eficiente em biofilmes maduros de *S. aureus*, incluindo as cepas isoladas de vacas mastísticas.

Estudos futuros sobre o comportamento das nanopartículas em relação às EPS, utilizando técnicas microscópicas, poderão esclarecer os possíveis mecanismos da atividade anti-biofilme dessas nanopartículas.

## Referências

- Borges, S., Silva, J., Teixeira, P. (2012). Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 677-682. doi: 10.1007/s10482-011-9666-y.
- Cardozo, V.F., Lancheros, C.A., Narciso, A.M., Valereto, E.C., Kobayashi R.K., Seabra, A.B., Nakazato, G. (2014). Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. *International Journal of Pharmaceutics* 473, 20-29. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.051.
- Craven, M., Kasper, S.H., Canfield, M.J., Diaz-Morales, R.R., Hrabie, J.A., Cady, N.C., Strickland, A.D. (2016). Nitric oxide-releasing polyacrylonitrile disperses biofilms formed by wound-relevant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 120, 1085-1099. doi: 10.1111/jam.13059.
- Duong, H.T., Jung, K., Kutty, S.K., Agustina, S., Adnan, N.N., Basuki, J.S., Kumar, N., Davis, T.P., Barraud, N., Boyer, C. (2014). Nanoparticle (star polymer)

delivery of nitric oxide effectively negates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Biomacromolecules*. 15, 2583-2589. doi: 10.1021/bm500422v.

Kroll, A., Behra, R., Kaegi, R., and Sigg, L. (2014). Extracellular polymeric substances (EPS) of fresh water biofilms stabilize and modify CeO<sub>2</sub> and Ag nanoparticles. *PLoS ONE* 9, e110709. doi:10.1371/journal.pone.0110709.

Nevius, B. A., Chen, Y. P., Ferry, J.L., Decho, A.W. (2012). Surface- functionalization effects on uptake of fluorescent polystyrene nanoparticles by model biofilms. *Ecotoxicology* 21, 2205–2213. doi:10.1007/s10646-012-0975-3.

Privett, B.J., Broadnax, A.D., Bauman, S.J., Riccio, D.A., Schoenfisch, M.H. (2012). Examination of bacterial resistance to exogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*. 26, 169-173.

Stewart, P.S., Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358,135–138.doi:10.1016/S0140-6736(01)05321-1.