



Comunicação

[Communication]

Atividade antibacteriana de nanopartículas de polipirrol diante de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas e cabras com mastite

[Antibacterial behavior of polypyrrole nanoparticles against *Staphylococcus aureus* isolated from cows and goats with mastitis]

A.C. Acosta¹, A.S. Santos¹, F.A.G. Silva², E.S. Medeiros¹,
H.P. de Oliveira², M.M. Costa³, A.W.C. Fernandes³,
J.W. Pinheiro Júnior¹, R.A. Mota¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

²Universidade Federal do Vale do São Francisco - Instituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais - Juazeiro, BA

³Universidade Federal do Vale do São Francisco - Petrolina, PE

Os avanços na genética animal, no manejo, na alimentação e no desenvolvimento de novos desinfetantes e antimicrobianos permitiram um crescimento constante da indústria leiteira, não somente com o incremento da produção do leite, mas também com uma melhora significativa da qualidade higiênico-sanitária desse alimento. Porém, as infecções intramamárias (IMI) em ruminantes são as principais causas de perdas na indústria leiteira no mundo (Halasa *et al.*, 2007). *S. aureus* apresenta vários fatores de virulência; um deles é a capacidade de formar biofilmes, importante mecanismo de sobrevivência das bactérias no nicho extracelular, que confere proteção diante do sistema imune do hospedeiro e ação de agentes antimicrobianos (Melchior *et al.*, 2006).

O polipirrol (PPy) é um dos polímeros mais estudados como agente bactericida. A polimerização do pirrol produz cargas positivas ao longo da cadeia de PPy, sendo uma carga positiva formada a partir da união de três a cinco monômeros. As cargas positivas são responsáveis pela atividade bactericida, e esse efeito se deve à ruptura da membrana lipídica que recobre a bactéria, com a consequente lise celular por essas cadeias de polímeros (Varesano *et al.*, 2013).

Observa-se um contínuo aumento no número de isolados de *S. aureus* resistentes à metilicina

causadores de infecções em animais domésticos. Nesse sentido, novas estratégias são necessárias para identificar e desenvolver a próxima geração de medicamentos ou agentes antimicrobianos. Objetivou-se neste estudo avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas de polipirrol (PPy-NPs) em água diante de *S. aureus* produtores ou não de biofilmes, isolados de leite de vacas e cabras com mastites.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com licença número 079/2014. Foram coletadas 1000 amostras de leite de vacas e 1253 de cabras, seguindo-se as recomendações do Conselho Nacional de Mastites (Laboratory, 1999). As amostras foram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas (4°C–10°C), onde a lactocultura primária foi realizada em placas de ágar sangue a 5%, e incubadas a 37°C, realizando leituras às 24h, 48h e 72h.

Na identificação presuntiva do *S. aureus*, usou-se a metodologia descrita por Zecconi *et al.* (2006), e o diagnóstico confirmatório foi realizado mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR), com a amplificação de um fragmento de 296 nucleotídeos do gene *nuc*. A extração do DNA foi realizada a partir das culturas bacterianas utilizando-se o kit comercial Wizard[®] Genomic

DNA *Purification* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os componentes da reação de PCR e as condições de amplificação foram descritos por Acosta *et al.* (2018).

A caracterização fenotípica para formação de biofilme foi realizada por meio do teste de aderência em microplacas de 96 poços, mediante a utilização da metodologia descrita por Merino *et al.* (2009), sendo usados como controles positivos e negativos *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente. Realizaram-se leituras de densidade óptica (DO) a 620nm no leitor de microplacas de ELISA (Multiskan Go Thermo Scientific). As amostras foram classificadas em quatro categorias (Stepanović *et al.*, 2000), relacionando as médias de DO com a DO do controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228), sendo utilizados os seguintes critérios: sem produção de biofilme (DO amostra \leq DO controle negativo), fraca produção de biofilme (DO controle negativo < DO amostra \leq 2×DO controle negativo), moderada produção de biofilme (2×DO controle negativo < DO amostra \leq 4×DO controle negativo) e forte produção de biofilme (DO amostra > 4×DO controle negativo).

Para a preparação de PPy-NPs, foi pesado 1,08g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e solubilizado em água mili-Q (100mL), sendo, em seguida, adicionado a 500 μ L de pirrol (0,483g). A suspensão resultante foi mantida sob agitação intensa durante 45min, e, logo após, uma suspensão aquosa (50mL) de persulfato de amônio (0,256g) lentamente foi adicionada, gota a gota, à suspensão anterior e mantida sob agitação durante 35min. Ao final, a suspensão de PPy-NPs com uma concentração de 2mg/mL de soluto foi mantida a 4°C, durante 24h. As medidas de tamanho de partículas foram realizadas no ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern).

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de PPy-NPs em água foram determinadas por meio da metodologia de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (Methods..., 2015). Foram usados como controles as cepas *S. aureus* ATCC 25938 e *S. epidermidis* ATCC 12228. As PPy-NPs em água, com uma concentração inicial de 2mg/mL, foram diluídas 1:2, com MGB já inoculado com o isolado a ser testado. As

concentrações de PPy-NPs testadas foram 500 μ g, 250 μ g, 125 μ g, 62,5 μ g, 31,25 μ g e 15,63 μ g. As microdiluições em placas foram incubadas a 35°C, por 20h, sendo realizadas leituras de DO a 600nm no leitor de microplacas de ELISA (Multiskan Go Thermo Scientific), em dois momentos (0h e 20h). A CIM foi definida como a menor concentração de PPy-NPs em água que inibiu mais do que 75% do crescimento bacteriano, e a CBM como a mínima concentração que resultou na inativação de 99% das células bacterianas, determinada pelo método de repique em placa de ágar Mueller Hinton, não se observando crescimento bacteriano visível.

Um total de 138 isolados de *S. aureus* foi identificado mediante a classificação fenotípica e a amplificação do fragmento de 296bp do gene *nuc*. Do total de isolados recuperados, 112 (81,16%) foram de amostras de leite de vacas, e 26 (18,84%) de leite de cabras. Cinquenta e quatro isolados (48,21%) obtidos de leite de vaca não produziram biofilme, 36 (32,14%) apresentaram fraca produção de biofilme, 17 (15,18%) moderada produção, e cinco (4,46%) forte produção de biofilme. Por outro lado, a produção de biofilme nos *S. aureus* obtidos de cabras foi negativa em 18 (69,23%) isolados e fraca em oito isolados (30,77%).

Tendo em vista que a formação de biofilme é um dos mais importantes mecanismos de sobrevivência da bactéria que vive no nicho extracelular (Melchior *et al.*, 2006), a alta frequência de isolados não produtores de biofilme observada no presente estudo sugere que a pressão de seleção microbiana exercida por antimicrobianos é inferior nos isolados incluídos neste estudo, quando comparados com os isolados de *S. aureus* causadores de mastites dos países incluídos na coleção internacional (Bélgica, Canadá, Itália e Suíça) (Bardiau *et al.*, 2016). Outro estudo realizado no Brasil obteve resultados similares aos descritos no presente trabalho em relação ao número de isolados não produtores de biofilme. Lee *et al.* (2014) identificaram o maior número de isolados de *S. aureus* agrupados na categoria de não produtores de biofilme.

O resultado do tamanho de partículas indica uma distribuição para valores na ordem de 16,79 \pm 4,95nm, com índice de polidispersão de 0,5832 e potencial zeta de -60,3mV. Esse valor é

Atividade antibacteriana

justificado pela camada de surfactante aniônico (SDS) que recobre o polipirrol, fornecendo a estabilidade para a dispersão em meio aquoso. A CIM das PPy-NPs foi de 125µg/mL para 100% dos isolados avaliados (138). O efeito inibitório

no crescimento bacteriano foi resultado da atividade bactericida das PPy-NPs nessa concentração (125µg/mL), sendo isso constatado nos testes para determinar a CBM (Fig. 1).

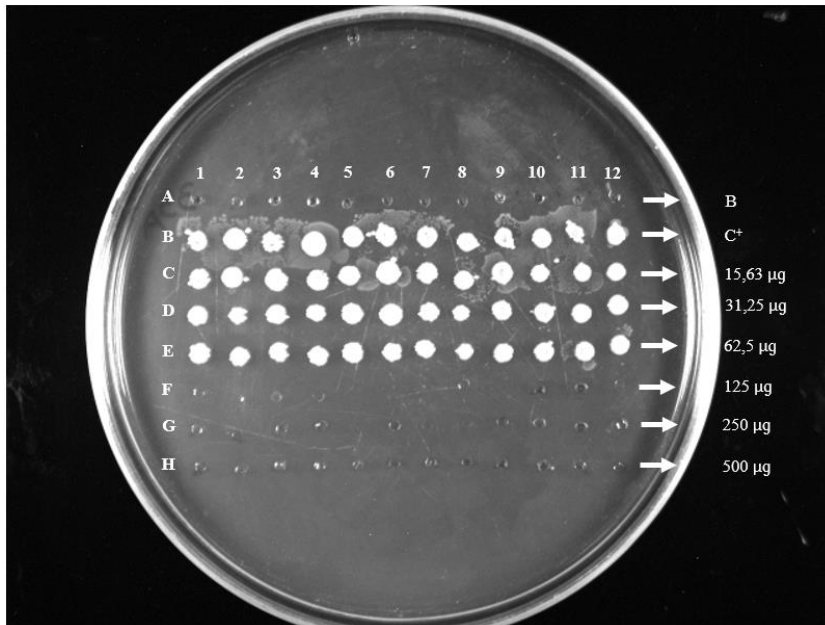


Figura 1. Concentração mínima bactericida de PPy-NPs. B: caldo Mueller Hinton, C⁺: controle positivo de crescimento, concentrações de PPy-NPs testadas 500 - 15,63µg.

A contribuição do presente estudo está na determinação da menor concentração na qual essas PPy-NPs têm atividade bactericida diante de isolados de *S. aureus* obtidos de vacas e cabras com mastite, com diferentes perfis de virulência quanto à produção de biofilme. Esse achado vislumbra um novo caminho na prevenção e terapêutica das mastites causadas por *S. aureus*, uma vez que esse microrganismo é capaz de expressar uma ampla gama de fatores de virulência que permitem a evasão do sistema imune do hospedeiro e a diminuição na eficácia dos tratamentos com diferentes antimicrobianos.

Com relação à biocompatibilidade do PPy, já foram realizados estudos em sistemas *in vitro* e *in vivo*, e os resultados obtidos sugerem que compostos à base de PPy não oferecem risco para os tecidos vivos (Wang *et al.*, 2004). As interações eletrostáticas estabelecidas entre as PPy-NPs e a bactéria desencadeiam a desestabilização da parede celular, com posterior lise bacteriana (Varesano *et al.*, 2013), e, até o

presente momento, não foram descritos mecanismos de resistência pela bactéria, o que constitui um importante fator para incentivar futuras pesquisas com essas PPy-NPs.

As PPy-NPs em água apresentaram efeito bactericida a partir da concentração de 125µg/mL em 100% dos isolados de *Staphylococcus aureus* avaliados, independentemente da capacidade de produção de biofilme. Esses resultados dão suporte para estudos futuros da atividade de PPy-NPs *in vitro* e *in vivo*.

Os autores gostariam de mostrar agradecimentos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), com o número de processo IBP-0439-5.05/12, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com o número de processo 442746/2014-8.

Palavras-chave: biofilme, composto de polímero, infecção intramamária, *S. aureus*

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the antibacterial behavior of polypyrrole nanoparticles (PPy-NPs) in water against biofilm producer or not *S. aureus* isolated from cows and goats with mastitis. One hundred and thirty-eight isolates of *S. aureus* were initially evaluated for biofilm formation by spectrophotometry in microplates. In addition, the minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of PPy-NPs in water for planktonic *S. aureus* were determined. From the bovine samples analyzed, 5 (4.46%) *S. aureus* isolates showed a strong biofilm production, 17 (15.18%) moderate production, 36 (32.14%) with weak production and 54 (48.21%) did not produce biofilms. Strains from goats (26) showed no biofilm production in 18 (69.23%) strains and weak biofilm production in 8 (30.76%) strains. The MIC and MBC of *S. aureus* to PPy-NPs were found in the same concentration (125µg/mL) in all strains tested, regardless of biofilm production or not. This finding provides a new insight into the interaction between PPy-NPs and *S. aureus*, and will offer potential benefits for the control of mastitis.

Keywords: biofilm, polymer composite, intramammary infection, *S. aureus*

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A.C.; OLIVEIRA, P.R.F.; ALBUQUERQUE, L. *et al.* Frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes in milk of cows and goats with mastitis. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.38, p.2029-2036, 2018.

BARDIAU, M.; CAPLIN, J.; DETILLEUX, J. *et al.* Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Vet. Microbiol.*, v.185, p.1-6, 2016.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O. *et al.* Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet. Q.*, v.29, p.18-31, 2007.

LABORATORY and field handbook on bovine mastitis. Madison, WI.: National Mastitis Council Inc., 1999.

LEE, S.H.I.; MANGOLIN, B.L.C.; GONÇALVES, J.L. *et al.* Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.1812-1816, 2014.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.*, v.171, p.398-407, 2006.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M. *et al.* Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v.191, p.832-843, 2009.

METHODS for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Document M07-A10. Approved standard. 10.ed. Wayne, PA: CLSI, 2015. 35p.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, v.40, p.175-179, 2000.

VARESANO, A.; VINEIS, C.; ALUIGI, A. *et al.* Antibacterial efficacy of polypyrrole in textile applications. *Fibers Polym.*, v.14, p.36-42, 2013.

WANG, X.; GU, X.; YUAN, C. *et al.* Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. Part. A*, v.68, p.411-422, 2004.

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E. *et al.* Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, v.40, p.177-183, 2006.