

RENATA DE FREITAS LEITE

**Efficacy of polyhexamethylene biguanide nanoparticles to control
mastitis causing *Staphylococcus aureus***



Pirassununga

2023

RESUMO

LEITE, R. F. **Eficácia de nanopartículas de biguanida de polihexametileno para o controle de *Staphylococcus aureus* causadores de mastite bovina.** 2023. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Staphylococcus aureus é uma das principais causas de mastite crônica em vacas leiteiras, em razão de fatores de virulência que permitem a colonização do tecido mamário, a evasão do sistema imune e menor ação dos antimicrobianos. A biguanida de polihexametileno (PHMB) é um polímero que apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana, inclusive contra patógenos causadores de mastite bovina. Considerando que a nanotecnologia é uma estratégia inovadora contra doenças infecciosas uma vez que potencializa a atividade antimicrobiana dos princípios ativos e geralmente apresenta baixa toxicidade, o objetivo geral deste estudo foi verificar a eficácia de uma nanoformulação composta por biguanida de polihexametileno (PHMB NPs) contra *Staph. aureus* causadores de mastite. A presente tese foi organizada em dois estudos. No Estudo 1, avaliamos a atividade antimicrobiana das PHMB NPs e PHMB contra 20 isolados de *Staph. aureus* pela metodologia de microdiluição em caldo para determinar as respectivas concentrações inibitórias mínimas (CIM) em comparação a o gluconato de clorexidina (CHG), iodo-povidona (PVP-I) e dicloroisocianurato de sódio (NaDCC). PHMB-NPs inibiram 90% dos isolados testados com menor valor de CIM ($<0,03 \mu\text{g/mL}$), seguido por CHG ($\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$), PHMB ($\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$), NaDCC ($\geq 500 \mu\text{g/mL}$) e PVP-I ($\geq 8.000 \mu\text{g/mL}$). No Estudo 2, selecionamos e avaliamos 10 isolados de *Staph. aureus* os quais apresentaram resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite, além da capacidade de invadir células epiteliais mamárias bovinas (células MAC-T) e de formar biofilme. O estudo 2 foi dividido em 2 experimentos. O Experimento 1 avaliou o potencial de uso de PHMB NPs e PHMB para tratamento intramamário em isolados de *Staph. aureus* formadores de biofilmes. Primeiro, verificamos que as células MAC-T toleraram PHMB NPs e PHMB até $4 \mu\text{g/mL}$. Em seguida, investigamos as atividades anti-biofilme de PHMB-NPs e PHMB, pelos ensaios de cristal violeta e contagem de colônias. Ambos compostos apresentaram alta eficácia na prevenção da formação de biofilme nas concentrações $\geq 0,12 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. No entanto,

PHMB NPs e PHMB apresentaram eficácia limitada contra biofilmes pré-formados. O Experimento 2 avaliou a eficácia de PHMB NPs e PHMB para desinfecção de tetos pelo uso de modelos de tetos excisados (CHG, PVP-I e NaDCC foram usados como controle). PHMP NPs não reduziram significativamente *Staph. aureus* recuperados da superfície dos tetos (redução média de 37,57%) em relação à PHMB livre e aos controles (tetos não tratados e desinfetantes), o que pode estar relacionado a um insuficiente tempo de contato. Finalmente, nossos resultados sugerem que PHMB NPs e PHMB apresentam alto potencial para inibição do crescimento e da formação de biofilme por *Staph. aureus*.

Palavras-chave: biguanida de polihexametileno, desinfecção dos tetos, nanotecnologia, *Staphylococcus aureus*, tratamento intramamário.

ABSTRACT

LEITE, R. F. **Efficacy of polyhexamethylene biguanide nanoparticles to control mastitis causing *Staphylococcus aureus***. 2023. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Staphylococcus aureus is a bacteria associated with chronic mastitis due to virulent properties that enables to colonize cow's mammary gland and to evade immune system and antimicrobial therapy. Polyhexamethylene biguanide (PHMB) is a polymer that presents a broad spectrum of antimicrobial activity, even against mastitis causing pathogens. Considering that nanotechnology is an innovative strategy against infectious diseases once it enhances the antimicrobial activity of the active compounds and usually presents low toxicity, the general objective of this study was to verify the efficacy of a nanoformulation composed of polyhexamethylene biguanide (PHMB NPs) against mastitis causing *Staph. aureus*. The present thesis was structured in 2 studies. In the Study 1, we evaluated the antimicrobial activity of PHMB NPs and PHMB against 20 *Staph. aureus* by microdilution assay to determine their minimum inhibitory concentrations (MIC) compared with chlorhexidine gluconate (CHG), povidone-iodine (PVP-I), and sodium dichloroisocyanurate (NaDCC). PHMB-NPs inhibited 90% of tested isolates at the lowest MIC value ($<0.03 \mu\text{g/mL}$), followed by CHG ($\geq 0.25 \mu\text{g/mL}$), PHMB ($\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$), NaDCC ($\geq 500 \mu\text{g/mL}$) and PVP-I ($\geq 8,000 \mu\text{g/mL}$). In Study 2, we selected and evaluated 10 *Staph. aureus* isolates, which were resistant to antimicrobials used for mastitis treatment, and presented the ability to invade bovine mammary epithelial cells (MAC-T cells) and to form biofilm. Study 2 was divided into 2 experiments. Experiment 1 focused on the possibility of PHMB NPs and PHMB use for intramammary treatment aiming to combat biofilm infection. First, we verified that MAC-T cells tolerated PHMB NPs and PHMB till $4 \mu\text{g/mL}$. Then, we investigated the PHMB NPs and PHMB anti-biofilm activities by crystal violet and colony count assays. Both presented a high efficacy to prevent biofilm formation at the concentrations $\geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ and $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, respectively. However, PHMB NPs and PHMB presented a limited efficacy against preformed biofilms. Experiment 2 focused on the use of PHMB NPs and PHMB as a teat disinfectant using the excised teat model (CHG, PVP-I, and NaDCC were used as

control). PHMP NPs did not significantly reduced recovered *Staph. aureus* from teats (mean reduction of 37.57%) comparing to undipped control and to the other disinfectants, which may be related to a short contact. Finally, our results suggest that PHMB NPs and PHMB present a high potential to inhibit *Staph. aureus* growth and biofilm formation.

Keywords: intramammary treatment, nanotechnology, polyhexamethylene biguanide, *Staphylococcus aureus*, teat disinfection.