



CYNTHIA PENONI VOLPI ABREU

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE
DE NANONOMATERIAIS COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NA MEDICINA VETERINÁRIA**

LAVRAS – MG

2017

CYNTHIA PENONI VOLPI ABREU

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE
DE NANONOMATERIAIS COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NA MEDICINA VETERINÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo animal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Raimundo Vicente de Sousa (orientador)

Dr. Humberto de Mello Brandão (co-orientador)

LAVRAS – MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Abreu, Cynthia Penoni Volpi.

Produção e avaliação de toxicidade de nanomateriais com
potencial aplicação da medicina veterinária / Cynthia Penoni
Volpi Abreu. - 2017.

101 p. : il.

Orientador(a): Raimundo Vicente de Sousa.

Coorientador(a): Humberto de Mello Brandão.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Biopolímeros. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Nanomateriais.
I. Sousa, Raimundo Vicente de. II. Brandão, Humberto de Mello.
III. Título.

CYNTHIA PENONI VOLPI ABREU

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE
DE NANONOMATERIAIS COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NA MEDICINA VETERINÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e metabolismo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de março de 2017.

Dr. Humberto de Mello Brandão

Embrapa Gado de Leite

Dr. Flademir Wouters

UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

LAVRAS – MG

2017

AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Esse trabalho é fruto de uma construção coletiva, portanto tomo este pequeno espaço para tornar público este agradecimento.

Primeiramente a Deus por permitir viver, ter saúde e enfrentar os obstáculos diários, e com Sua sabedoria, atingir os objetivos.

A minha família pelo amor e apoio incondicionais, sobretudo minha mãe Ana, vovó Cecília e vovô Artur que não medem esforços para me fazer sempre mais confiante. O tempo longe mostrou o quão importante vocês são e que ninguém é capaz de viver longe de seu ninho por muito tempo. Aos meus irmãos Gaby e Marcelo, espero ser um espelho para vocês e que toda essa trajetória sirva de incentivo para seguirem sempre em busca dos objetivos sem parar pelo caminho. Ao papai Marcelo (*in memoriam*) que com certeza ficaria muito orgulhoso deste momento, essa vitória é nossa “Matuto”!!! Amo vocês! Aos demais familiares também agradeço por todas as palavras de incentivo nos momentos em que pensei em desistir.

Ao meu orientador Raimundo, que desde antes de ingressar no curso de Med. Veterinária é um grande mestre, uma pessoa que me espelho e um dia pretendo chegar a pelo menos 10% de sua competência e sabedoria! Muito obrigada por estes 9 anos de ensinamentos, levarei para toda vida essa bagagem, que certamente não é pequena.

Ao meu co-orientador, Humberto Brandão, uma pessoa ímpar. Sem palavras para descrever a capacidade intelectual deste pesquisador. Sou sua fã!!! Já falei e preciso deixar registrado, você é um ponto totalmente fora da curva, muito obrigada por todo o ensinamento desde a nanotecnologia até mesmo lições

sobre a vida. Obrigada por compartilhar seu conhecimento de forma tão única, fazendo sempre com que a “*a conta seja bem simples*”!

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de cursar o Mestrado, juntamente ao programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias e ao Departamento de Medicina Veterinária que sempre estiveram a postos para servir. Aos professores pelo ensinamento, sobretudo a prof. Ana Paula Peconick a quem tenho grande apreço e admiração. Aos funcionários, aqui representados pelo Willian, técnico do laboratório de Fisiologia e farmacologia, que em todos estes anos esteve sempre pronto para me ajudar.

A Embrapa Gado de Leite, mais especificamente aos laboratórios de Nanotecnologia, Microbiologia do leite, Imunologia e Reprodução que desde quando cheguei em 2014 me receberam de braços abertos. Aos pesquisadores Humberto, Wanessa, Juliana, Alessandro e Dra. Cida obrigada de coração. A Letícia, Joel e Marcos pelos ensinamentos, socorro nos momentos de falta de reagente e bons momentos compartilhados. As amigas do laboratório de Nano: Fabiana, Camila, Dani e Patrícia agradeço pelos momentos e sofrimentos compartilhados, por toda ajuda na condução do experimento e sobretudo por aturarem meus momentos de (quase) surto.

As amigas que fiz em Juiz de Fora e que fizeram da minha estadia longe da família muito mais agradável e leve... dividimos momentos maravilhosos juntas, farão muita falta nos meus dias Thyara, Fabiana, Lara, Carol, Bruna, Ariane e Tati. Vocês foram minha família enquanto estivemos longe das nossas!

A Capes pelo apoio financeiro com a bolsa de estudos, essencial para a execução deste trabalho. Fapemig, CNPq.

A todos que torceram por mim, muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1:** Espectro na região do Raman de (a) Colônia bacteriana ; (B) Extrato bruto biofilme; (C) PNAG nativo e (D) PNAG desacetilado.54
- Figura 2:** Espectro Infravermelho de (A) Extrato bruto biofilme; (B) PNAG nativo e (C) PNAG desacetilado55
- Figura 3:** Espectro de RMN de ^1H do biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* (D_2O 500 MHz).....57
- Figura 4:** Espectro de RMN de ^{13}C do biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* (D_2O 125 MHz)58
- Figura 5:** Espectro de RMN de ^2D - HSQC do biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* (D_2O 500 MHz)58
- Figura 6:** Médias de mortalidade dos linfócitos e monócitos em relação aos tratamentos60
- Figura 7:** Gráficos de densidade de citometria de fluxo de células mononucleares de sangue periférico bovino (PBMC)61

ARTIGO 2

- Figure 1.** X-ray diffraction (PXRD) patterns of (a) TiO_2 and (b) ZnO74
- Figure 2** Histograms of ZnO (a) phase micro and(b) phase nano obtained from FEG-SEM images.....76
- Figure 3** FEG images of ZnO showing the different particle morphologies. (a) Agglomerated particles showing not well defined morphology; (b) and (c) Agglomerated particles of diverse morphologies, containing long and short rods,

prisms and faceted rods with large size distribution; (d) Particles dispersed in BSA solvent, where only major particles are seen: regular and irregular prisms.....77

Figure 4 FEG images of TiO₂. (a) and (d) Very agglomerated particles of nanometric dimension (< 10 nm); (b) Particles of irregular morphology and size distribution; (c) Biphasic material containing agglomerated nanometric particles and micrometric faceted particles.....78

Figure 5. Histopathology of a - Kidney; b - liver; c - heart; d - lung; e - spleen; f - pancreas; g - intestine; h - muscle; i - brain; j - lymph nodes.....84

Figure 6. Scheme of the sequential dilution and dispersion followed for the TiO₂ and ZnO NPs characterizations by the DLS Technique (size measurement and Zeta potential).....93

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Table 1. Crystallite size and associated error SD of NMs	74
Table 2. Dimensions of NMs measured using Image J	75
Table 3. Specific surface area, pore volume and size for ZnO and TiO ₂	79
Table 4. Size measurements of TiO ₂ nanoparticles sequentially suspended in simulated digestive fluids	81
Table 5. Size measurements of ZnO nanoparticles sequentially suspended in simulated digestive fluids.....	81
Table 6. Measurements of zeta potential for TiO ₂ NPs sequentially suspended in simulated digestive fluids.....	82
Table 7. Measurements of the zeta potential of ZnO nanoparticles sequentially suspended in simulated digestive fluids	83
Table 8. Operation parameters for FEG-SEM imaging	92

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	MASTITE.....	11
2.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	14
2.2.1	<i>Biofilme</i>	15
2.3	ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA MASTITE CAUSADAS POR <i>S. AUREUS</i>	19
2.4	DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA O CONTROLE DA MASTITE CAUSADAS POR <i>S. AUREUS</i> ...	19
2.5	IMPORTÂNCIA DO TAMANHO E DAS CARACTERÍSTICAS SUPERFICIAIS DO MATERIAL PARTICULADO DE COMPONENTES FARMACÊUTICOS NA IMUNOMODULAÇÃO.	22
2.6	NANOPARTÍCULAS COMO POTENCIAIS ADJUVANTES	24
2.7	RAMAN	26
2.8	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	27
2.9	CITOMETRIA DE FLUXO.....	29
2.10	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ – DLS	29
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	433
ARTIGO 1	APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO POLI-N-ACETILGLUCOSAMINA EXTRAÍDOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ..	43
	RESUMO.....	44
	INTRODUÇÃO	45
	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1	CULTIVO DE BACTÉRIAS	47
2.2	PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO	48
2.3	DESACETILAÇÃO DO POLÍMERO.....	48
2.4	ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	49
2.5	ESPECTROSCOPIA RAMAN	49
2.6	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR, TAMANHO E POTENCIAL ZETA (DLS)	49
2.7	COLETA E CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BOVINOS	50
2.8	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE AGUDA	50
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	51

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	51
4	CONCLUSÕES.....	63
	ABSTRACT.....	644
	REFERÊNCIAS	655
	ARTIGO 2	70
	TITANIUM DIOXIDE AND ZINC OXIDE NANOPARTICLES DID NOT PRESENT ORAL ACUTE TOXICITY IN FEMALE MICE.....	70
	INTRODUCTION	71
	RESULTS.....	73
	CHARACTERIZATION OF TiO ₂ AND ZnO NANOPARTICULES.....	73
	<i><u>SPECIFIC SURFACE AREA (SSA) BY THE BET</u></i>	78
	IN VITRO EXPERIMENT	80
	IN VIVO EXPERIMENT	83
	<i><u>Animals receiving TiO₂</u></i>	833
	<i><u>Animals receiving ZnO</u></i>	833
	DISCUSSION.....	844
	CONCLUSIONS	899
	METHODS	900
	CHARACTERIZATION OF TiO ₂ AND ZnO NANOPARTICULES.....	90
	<i><u>Powder X-ray diffraction (PXRD):</u></i>	90
	<i><u>Field emission gun-scanning electron microscopy (FEG-SEM)</u></i>	91
	<i><u>Specific surface area (SSA) by the BET</u></i>	92
	IN VITRO EXPERIMENT	93
	<i><u>Dispersion procedure for the DLS measurements of the ZnO and TiO₂ nanoparticles</u></i>	93
	<i><u>Preparation of the solutions simulating biological fluids were TiO₂ and ZnO were suspended</u></i>	94
	IN VIVO EXPERIMENT	95
	<i><u>Histopathology</u></i>	97
	<i><u>Statistical analysis</u></i>	98
	ACKNOWLEDGEMENTS:	98

REFERENCES: 98

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é considerada uma das principais enfermidades de rebanhos leiteiros no mundo. O caráter infeccioso e as modificações composicionais que ocorrem no leite conferem à mastite elevada importância econômica dentro dos sistemas produtivos. Adicionalmente, a mastite oferece riscos à saúde pública pela possibilidade de contaminação do leite com resíduos de antibióticos decorrentes do tratamento, ou mesmo com microrganismos ou suas toxinas.

Para minimizar os prejuízos e os riscos associados a esta doença faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para serem disponibilizadas aos produtores de leite. No presente trabalho, foram produzidas nanopartículas derivadas de biopolímeros, bem como estudadas a toxicidade de nanopartículas metálicas/cerâmicas.

Estes nanomateriais foram eleitos por apresentarem potencial atividade imunomoduladora, criando, portanto, a perspectiva para desenvolvimento futuro de uma vacina nanoparticulada que consiga estimular simultaneamente a imunidade humoral e celular de forma mais efetiva.

Neste contexto, com este trabalho objetivou-se avaliar a citotoxicidade de biopolímeros bem como de sua variação com modificação química, extraído de uma estirpe *Staphylococcus aureus*, isolada de um caso clínico de mastite bovina e avaliar a toxicidade aguda de duas nanopartículas que possam ser utilizadas em composições farmacêuticas de uma vacina para mastite bovina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mastite bovina

Mastite é uma doença inflamatória da glândula mamária, podendo ser de origem infecciosa, traumática ou química (BRADLEY, 2002). Dentro dos sistemas de produção, sua importância é tamanha, que muitos autores a apontam como a maior causa de perdas econômicas em rebanhos leiteiros, as quais são decorrentes da diminuição da produção e qualidade do leite, dos gastos com tratamentos e despesas veterinárias, do aumento da mão de obra e descarte de leite e animais (ASLANTAS e DEMIRT, 2016; SANKAR, 2016). Além disso, a mastite também pode oferecer riscos à saúde pública, pela possibilidade de contaminação do leite com resíduos de antibióticos ou com microrganismos e suas toxinas (FERNANDES *et al.*, 2011)

Com relação à manifestação clínica, a mastite pode ser classificada em clínica e subclínica (MENDONÇA, 1999). A forma de manifestação da mastite é de caráter multivariável, a destacar: susceptibilidade do animal, que pode estar relacionada a variação genética e mecanismos imunológicos (GIRAUDO, 1996), dose infectante (AVANCINI e WIEST, 2008) e fatores de virulência do agente causal (MARQUES *et al.*, 2013). Especificamente, a forma subclínica é caracterizada pela elevação da contagem das células somáticas (CCS) e redução da produção de leite, com discreta modificação de sua composição (DJABRI *et al.*, 2002). Destaca-se que esta é a forma mais predominante de ocorrência nos rebanhos leiteiros, 90 a 95% dos casos, com prevalência 15 a 40 vezes maior que a forma clínica (BRITO *et al.*, 1997; MELLO *et al.*, 2012). No caso da manifestação na forma clínica ela pode ser subdividida em três classificações conforme as manifestações, onde a forma subaguda se caracteriza por pequenas alterações como leve inchaço no quarto mamário e pequenas alterações no leite, a forma aguda que caracteriza pelo início súbito com rubor, inchaço, dureza e dor no quarto mamário acometido, adicionada a uma redução na produção de leite, sinais sistêmicos como febre e anorexia podem estar presentes e a última forma superaguda em que os sinais clínicos se assemelham a mastite aguda e

adicionalmente o animal pode apresentar depressão, aumento das frequências cardíaca e respiratória, perda de coordenação motora, extremidades frias, reflexo pupilar reduzido, desidratação e diarreia (PHILPOT e NICKERSON, 1991). O animal com mastite clínica apresenta alta quantidade de leucócitos no leite, tornando assim visível os grumos destas células de defesa facilmente identificáveis quando se retira um jato de leite e deposita sobre um recipiente de cor escura, este procedimento é conhecido como Teste da Caneca, que é amplamente utilizado a campo como um método de diagnóstico rápido (SANTOS e FONSECA, 2007).

De uma forma geral, quando causada por microrganismos, esta doença é classificada em mastite ambiental ou contagiosa (MENDONÇA, 1999). A distinção entre os dois tipos de mastite ocorre em função das características do agente causal. No caso da mastite ambiental o principal reservatório é o ambiente em que a vaca se encontra, ou seja, a fonte de infecção é um microorganismo que está no local e coloniza a glândula mamária (SMITH e HOGAN, 1993). Por sua vez, no caso da mastite contagiosa o principal reservatório do microorganismo causal é outro animal infectado do rebanho, ou seja, a transmissão ocorre de animal para animal (FOX e GAY, 1993). Como agentes causadores da mastite pode-se citar uma grande variedade, incluindo micoplasma, leveduras, fungos e algas. Embora mais de 173 espécies, subespécies e sorotipos de microrganismos já tenham sido isolados de infecções na glândula mamária bovina (WATTS, 1988), a maioria das infecções é causada por bactérias (BRITO *et al.*, 2002). Considerando a fonte de infecção, os agentes da mastite são classificados em ambientais (*e.g.* *Escherichia coli*, coliformes, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus equinus* (anteriormente *S. bovis*) e outros *Streptococcus* do ambiente) e contagiosos (*e.g.*: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus coagulase-negativos*). Outra classificação divide os agentes da mastite em patógenos primários e

secundários. Os patógenos primários incluem *S. agalactiae* e outras espécies de *Streptococcus*, *S. aureus* e *Mycoplasma spp.* Os secundários incluem *C. bovis* e *Staphylococcus* coagulase-negativos (BRITO *et al.*, 2002).

Por apresentar alta prevalência, ser de difícil controle e, em muitos casos passar despercebida, a mastite causada por *S. aureus* se relaciona à elevadas perdas econômicas (DJABRI *et al.*, 2002). Assim, frente às grandes dificuldades de controle, mecanismos de evasão do sistema imune e resistência a antibióticos, o *Staphylococcus aureus* pode ser considerado um dos patógenos de maior importância na gênese da mastite (BRITO *et al.*, 2002).

2.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* foi proposto em 1884, por Rosenbach e inserido na família *Micrococaceae*. Após estudos moleculares e de perfis de ácidos graxos, composição de parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S promoveram a inclusão deste gênero em uma nova família, a *Staphylococcaceae* (GARRITY, 2006). *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, imóveis, com diâmetro entre 0,5 a 1,5µm. São bactérias anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então, produzem catalase (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GARRITY, 2006).

S. aureus são bactérias mesófilas e a sua temperatura de crescimento encontra-se na faixa de 7°C a 47,8°C e o pH variando de 4,2 a 9,3, com ótimo entre 7 a 7,5 (BERGDOLL, 1990). O crescimento ocorre em ágar nutriente e ágar-sangue (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012; QUINN *et al.*, 2011).

Em função da importância clínica e da grande variabilidade genética, com histórico de multirresistência à antibióticos, levaram a Organização Mundial da Saúde a classificar o *S. aureus* em recente ranqueamento de prioridade mundial de P&D como “alta prioridade” (WHO, 2017). Esta bactéria apresenta alta prevalência nos rebanhos bovinos leiteiros mundiais. Ela apresenta uma grande variabilidade genética conforme a região em que se encontra, o que dificulta o desenvolvimento de vacinas ou mesmo o controle farmacológico desta bactéria (DALEY *et al*, 1991).

Apesar de possuir diversos fatores de virulência, uma atenção especial foi dada ao biofilme. Isso se deve ao fato deste ser rico em polissacarídeos, os quais apresentam efeito imunomodulador (SADOWSKA *et al*, 2013), e porque materiais poliméricos são importantes fontes de matérias primas utilizadas para a síntese de nanopartículas (GIESE *et al*, 2011).

2.2.1 Biofilme

O biofilme pode ser definido como uma estrutura comunitária de células bacterianas protegida por uma matriz polissacarídica com proteínas que em conjunto apresentam características aderentes tanto à superfícies inertes como vivas (CAFISO, 2007). Nesta estrutura, que se apresenta como um hidrogel, as bactérias se comunicam com auxílio de pequenas moléculas, tal mecanismo é denominado como *quorum sensing* (SAGINUR *et al*. 2006). Sua formação é um importante fator de virulência atribuído ao seu potencial de indução de resistência a antibióticos, por retardar a fagocitose e estimular a inflamação (GOGOI-TIWARI *et al*, 2017).

Enquanto o microambiente sem biofilme pode ser heterogêneo onde as bactérias competem por espaço em condições variáveis, com limitação nutricional, dessecação, exposição a agentes químicos tóxicos, radiação UV e mudanças de pH e temperatura, no ambiente do biofilme elas encontram proteção e estabilidade ambiental para o crescimento e expansão da colônia. Assim, a formação de biofilme apresenta-se como uma estratégia para a sobrevivência da bactéria em ambiente hostil para sua proliferação (STOODLEY e STOODLEY, 2005).

A formação de biofilmes é um processo que inclui diversas etapas. Segundo Stoodley e colaboradores (2004), são descritas cinco etapas, onde as duas primeiras caracterizam-se por interação fraca entre o microorganismo e a superfície, seguida de forte adesão bacteriana mediada pela alteração do ácido teicóico, que sofre redução na esterificação da D-alanina, provocando aumento de aderência com conseqüente aumento da estabilidade (GROSS *et al.*, 2001). A terceira e quarta etapas envolvem agregação de células formando microcolônias e posterior maturação da estrutura tridimensional do biofilme. O quinto estágio compreende o retorno a motilidade quando as partes do biofilme são separadas.

Várias proteínas parecem estar envolvidas na etapa inicial de formação de biofilme, dentre elas as autolisinas, AtlE para os *S. epidermidis* e Atl para os *S. aureus* (FITZPATRICK, HUMPHERYS e O'GARA, 2005). Estas proteínas apresentam alta similaridade, sendo codificadas por gene cromossômico específico (HEILMAN *et al.*, 1997). Ainda não foi completamente esclarecido como a proteína AtlE possui a capacidade de ligação às superfícies, contudo, estudos com mutantes do gene *atlE* sugerem que estes mutantes apresentaram reduzida aderência primária ao poliestireno, baixa atividade de ligação à vitronectina e reduzida hidrofobicidade da proteína AtlE (TAKASAKI *et al.*, 2002). Segundo os autores, possivelmente estes motivos, reduziram a virulência dos mutantes.

A proteína de superfície que também parece estar associada à produção de biofilme é a *Bap* (*biofilm-associated protein*), observada em estirpes de *S. aureus* envolvidas em infecções de glândulas mamárias bovinas. O gene *bap* está contido em uma ilha de patogenicidade e codifica para uma proteína com 2.276 aminoácidos que atua na primeira fase de aderência à superfície (CUCARELLA *et al.*, 2004). Por sua vez, a proteína *Bhp* (*Bap homologue protein*) de 258kDa, parece exercer uma função semelhante em estirpes humanas de *S. epidermidis*, ou seja, ligação célula a célula, aderência a superfícies lisas e produção de biofilme (TORMO e KNECHT, 2005).

Na segunda fase, a bactéria ligada (direta ou indiretamente) à superfície do polímero produz e acumula um material polissacarídico extracelular com característica amorfa e mucoide, o biofilme (GOTZ, 2002). Além do polissacarídeo, aparentemente proteínas também estão envolvidas nesta fase de acumulação. Um importante exemplo é a proteína de 140 kDa associada à acumulação (*Aap*, *accumulation-associated protein*). Estudos com estirpes de *S. epidermidis* mutantes, que não expressam o gene *aap*, demonstraram que sua ausência reduz drasticamente esta fase (HUSSAIN *et al.*, 1997).

O glicocálix bacteriano desempenha papel preponderante na fase de formação do biofilme. É referido como PIA, e composto em sua grande maioria por um polímero de N-acetilglucosamina que é um dos principais responsáveis pela arquitetura do biofilme. A biossíntese do PIA é controlada pelo operon *ica* (MAIRA-LÍTRAN *et al.*, 2002), que é composto pelos genes *icaADBC*, responsáveis pela síntese propriamente dita e pelo gene *icaR* (gene repressor). Além do operon *ica*, outros genes também parecem estar envolvidos na regulação da síntese do biofilme, entre eles o *TcaR*, regulador associado ao *locus* de teicoplanina (KNOBLOCH *et al.*, 2004). Reguladores adicionais como o *SarA* e o fator σ^B (fatores relacionados ao estresse bacteriano) também já foram descritos

anteriormente como participantes desse processo (VALLE *et al.*, 2003; KNOBLOCH *et al.*, 2004).

Além dos mecanismos de regulação descritos acima, outros mecanismos também podem afetar a biossíntese deste polímero. Assim, a variação fenotípica na produção de biofilme é causada por diferentes mecanismos como o controle da síntese do PIA pela alternância da inserção e excisão do elemento *IS256*, fato que pode levar à regulação no nível de transcrição do *ica* (*dow-regulation*), ou mesmo através de uma mutação randômica em estirpes estafilocócicas com *IS256* negativa (NILSDOTTER-AUGUSTINSSON *et al.*, 2007). Isso pode ser uma das explicações do encontro de estirpes bacterianas que possuem o operon *ica*, contudo não produzem biofilme (ARAUJO *et al.*, 2006; NILSDOTTER-AUGUSTISSON *et al.*, 2007).

Fatores ambientais também estão associados à formação de biofilme, como por exemplo: a disponibilidade de glicose, cujo aumento induz a produção de biofilme (DOBINSKY *et al.*, 2003); a limitação de oxigênio que favorece a formação de polímero (CRAMTON *et al.*, 2001); e a depleção de ferro, apontada como estímulo à produção de biofilme, visto que, sob baixas concentrações de ferro, há uma significativa diminuição da formação do polissacarídeo constituinte do biofilme (JOHNSON *et al.*, 2005). Outro fator descrito como estimulador da produção de biofilme a presença de heparina no meio de cultura, que aumenta a interação célula a célula e queela os cátions de ferro (SHANKS *et al.*, 2005).

Klingenberg (2005), sugeriram que o acúmulo de biofilme pode favorecer a resistência bacteriana aos antimicrobianos, explicado pela maior concentração da droga em contato com a bactéria. Da mesma forma, células do sistema imune também têm o acesso às bactérias mecanicamente restringido (GOTZ, 2002). Nesse sentido, estratégias farmacológicas e imunológicas vinculadas à restrição de produção de biofilme têm sido usadas para o controle do *S. aureus*.

2.3 Estratégias de controle da mastite causada por *S. aureus*

O controle da mastite causada por *S. aureus* é um aspecto de fundamental importância para a redução da CCS e melhoria da qualidade e produção do leite (SOUZA, 2010). A aplicação de medidas de controle tais como a segregação ou descarte de animais infectados, cuidados higiênicos na ordenha e protocolos terapêuticos tem contribuído para restringir a disseminação dessa bactéria, mas a terapia com antibióticos constitui ainda uma parte essencial do seu controle (SOUZA, 2010).

Via de regra, animais entre o primeiro e terceiro parto apresentam taxas de cura mais elevadas que animais mais velhos e, quando a enfermidade crônica, o sucesso terapêutico pode ser ainda mais baixo (BARKEMA *et al.*, 2006). A resistência à penicilina parece ser um marcador para o insucesso do tratamento *in vivo*, independentemente do antibiótico administrado (TAPONEN *et al.*, 2003). Quando comparado o tratamento antimicrobiano durante o período de lactação e a fase seca, o segundo se apresenta com resultados superiores (BARKEMA *et al.*, 2006), fato que pode ser atribuído à localização predominante do *S. aureus* no interior dos ácinos glandulares e à ocorrência de neocompartimentalização (i.e. microabcessos e sobrevivência no interior de polimorfonucleares). O tratamento estendido para cinco dias com antibióticos e a associação da antibioticoterapia pelas vias parenteral e intramamária têm apresentado maior porcentagem de cura, implicando, no entanto, no aumento dos gastos com medicamentos e com descarte de leite (GONÇALVES *et al.*, 2015).

O uso de vacinas é uma estratégia promissora para aumentar a resistência dos animais às infecções intramamárias causadas por *S. aureus* e reduzir as consequências clínicas e econômicas desta infecção, diversas estratégias vacinais têm sido relatadas nas últimas décadas. Assim, vacinas com formas atenuada ou inativada de *S. aureus*, toxóides, ou outros componentes de virulência têm sido

avaliadas, mas os produtos disponíveis comercialmente têm mostrado eficácia limitada nas condições de campo (PEREIRA *et al.*, 2011). Enquanto algumas poucas formulações vacinais mostraram-se promissoras na recuperação da doença, poucas são as vacinas que impedem adequadamente o aparecimento de novas infecções (PEREIRA *et al.*, 2011).

O uso concomitante de vacina e antibioticoterapia é uma das estratégias mais promissoras para o incremento na taxa de cura e prevenção de novas infecções mamárias (ABEBE, *et al.*, 2016). Contudo, o próprio mecanismo de virulência, a maneira como adere ao tecido mamário e a produção de biofilme já são considerados fatores relevantes para o insucesso do tratamento (KIRK *et al.*, 1994). Desta forma, o uso da vacinação pode ser uma importante ferramenta auxiliar em programas de redução e controle da mastite (LANDIN *et al.*, 2015).

2.4 Desenvolvimento de vacina para o controle da mastite causadas por *S. aureus*

Medidas de controle para a mastite bovina tem como base três princípios básicos: eliminação de infecções existentes, prevenção de novas infecções e monitoramento da mastite. É ideal que o animal tenha uma maior resistência a novas infecções, bem como, o aumento da capacidade imune frente aos agentes patogênicos que já infectaram a glândula mamária (BOTARO *et al.*, 2015).

A forma mais simples de vacina é aquela produzida a partir de microrganismos íntegros ou lisados produzidos a partir de bactérias, com ou sem adjuvantes (SANTEMA *et al.*, 2009). A utilização de tais vacinas foi extensivamente estudada com vistas na redução da mastite por *S. aureus* desde 1970 (WILSON *et al.*, 2007). Os primeiros trabalhos que avaliaram o efeito das vacinas sobre mastite por *S. aureus* não obtiveram sucesso, pois foram utilizadas

bacterinas derivadas do crescimento *in vitro* deste agente pós inativação. Os resultados obtidos com o uso destas vacinas apontavam como vantagens a redução da gravidade dos sintomas e apresentavam efeitos positivos no aumento da taxa de cura espontânea, mas não houve redução do número de novas infecções.

A complexa variação dos fatores de virulência desse patógeno e o conhecimento limitado sobre a resposta imunitária adaptativa da glândula mamária têm sido empecilhos significativos para que formulações vacinais sejam bem sucedidas contra mastite estafilocócica (AITKEN *et al.*, 2011). Um dos principais desafios para o uso eficaz de vacinas contra *S.aureus* é a sua capacidade de promover uma resposta biológica eficaz no controle de bactérias resistentes à fagocitose que colonizam o compartimento glandular e, muitas vezes estão aptas para manutenção de sua viabilidade no ambiente intracelular de polimorfonucleares (PMN) (KESSEL *et al.*, 2014). Essas variáveis explicam os resultados heterogêneos relatados por Pereira e colaboradores (2010). Nessa revisão de literatura, nove artigos apresentaram efeito protetor da vacina em condições experimentais, cinco deles obtiveram resultados com proteção maior que 50% dos quartos mamários infectados, um resultou em proteção intermediária (30-50%), enquanto três resultaram em baixa proteção.

De uma forma geral, os adjuvantes normalmente utilizados, tais como hidróxido de alumínio e adjuvante incompleto de Freund, reforçam predominantemente a resposta humoral (MOTA *et al.*, 2006). O exopolissacarídeo, que é caracterizado por uma cadeia de poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG) possui forte atividade imunomoduladora e, quando conjugado ao toxóide diftérico funcionou como adjuvante vacinal (MAIRA-LITRAN *et al.*, 2005). A estrutura do PNAG já foi descrita com precisão por Joyce e colaboradores em 2003, contando com a caracterização por técnicas de ressonância magnética nuclear, onde a interpretação dos espectros dá embasamento para descrição detalhada da estrutura molecular do mesmo. Ovelhas lactantes imunizadas com PNAG

obtiveram resultados promissores na resolução de infecções mamárias, sugerindo que há indução de imunidade protetiva por polímero (PEREZ *et al.*, 2009).

Especificamente o grau de desacetilação da cadeia de PNAG é um fator importante em sua capacidade imunomodulatória, aumentando em função do aumento do grau de desacetilação da cadeia polimérica (GÓRSKA *et al.*, 2016). No estudo de Górska e colaboradores (2016) foi relatado que a administração de conjugados proteicos com PNAG desacetilados levaram a indução de imunização contra infecções mamárias e sistêmicas em ratos experimentalmente infectados com *S. aureus*.

Em adição ao potencial imunogênico natural do PNAG, é necessário destacar o papel fundamental dos adjuvantes, que conseguem potencializar a eficácia das vacinas para a mastite (COX e COULTER, 1997, YIP *et al.*, 1999). No entanto, é importante desenvolver vacinas que aumentem a imunidade celular e o tráfego de células do sistema monocítico fagocitário para a glândula mamária como uma estratégia para desenvolver a imunização eficaz (MOTA *et al.*, 2006).

2.5 Importância do tamanho e das características superficiais do material particulado de componentes farmacêuticos na imunomodulação.

Dependendo da composição e características químicas, micro e nanopartículas são reconhecidas como corpos estranhos ao organismo e são captadas por tipos celulares específicos, permitindo, assim, seu direcionamento majoritário para o sistema fagocítico, incluindo células de Langerhans, macrófagos e células dendríticas (DC) (DIERLING e CUI, 2005; NIKONENKO *et al.*, 2014).

Utilizando modelagem, Xu e colaboradores (2012) sugeriram que a captação celular de nanopartículas tem início pela aproximação e interações

eletrostáticas entre célula e partícula que, após sua ocorrência promove a evaginação e estiramento da membrana celular. Aparentemente, as interações entre cargas superficiais (indiretamente o potencial Zeta) da partícula impactam significativamente no processo de internalização, salientando que o excesso de cargas superficiais são desfavoráveis para o processo de internalização celular (KUBOTA *et al.*, 1983). Por sua vez, partículas com moderada densidade de cargas em sua superfície são mais adequadas para atingir a máxima captação celular (YAN *et al.*, 2013).

A entrada de nanopartículas no interior de células pode ocorrer tanto pela via passiva quanto por transporte ativo, contudo a via passiva é relativamente rara (FRÖHLICH, 2012). Cinco rotas de ingresso intracelular são descritas para nanopartículas: fagocitose, endocitose clatrina dependente, endocitose caoveolina dependente, endocitose independente de caoveolina ou clatrina e macropinocitose (FRÖHLICH, 2012; YAN *et al.*, 2013). Nas células que compõem o sistema imune, aparentemente, a endocitose mediada por receptores clatrina são mais importante para a absorção de partículas com tamanho inferior à 500nm, enquanto que partículas com mais de 500nm são preferencialmente absorvidas por fagocitose (KRUTH *et al.*, 1999; MANOLOVA *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2013). Assim, vale ressaltar que os diferentes mecanismos de captação celular podem acarretar em distinção no tipo de resposta imune, sendo, em parte, dependente do tamanho da partícula (YAN *et al.*, 2013).

O interstício dos tecidos é rico em matriz extracelular rica em proteínas fibrilares e proteoglicanos que determinam a velocidade de transporte de macromoléculas e pequenas partículas em função de seu tamanho, carga superficial e forma (THOMAS e SCHUDEL, 2015). Assim, é importante considerar que partículas com tamanho variando ente 10 e 100nm podem facilmente transitar no interstício e, com isso ganhar o sistema linfático e serem direcionadas para células dendríticas (CD) residentes no linfonodo (SWARTZ *et*

al., 2001). Por sua vez, partículas com mais de 100nm tendem a ter um trânsito mais lento no interstício celular e, com isso serem fagocitadas pelas células apresentadoras de antígeno (CAA) periféricas, enquanto macrófago apresentam tropismo por partículas maiores que 200nm, com maior capacidade fagocitária para partículas variando entre 200 e 600nm (KANCHAN e PANDA, 2007; SWARTZ *et al.*, 2001). No caso de partículas com diâmetro inferior a 10nm, também está descrita a possibilidade de sua drenagem para o capilar sanguíneo (SWARTZ *et al.*, 2001) escapando de uma ação mais efetiva das CAAs.

De uma forma geral, quando consideramos um mesmo material, partículas maiores (500-2000nm) favorecem uma resposta imune humoral, enquanto que partículas menores (20-200nm) favorecem uma resposta imune celular (FOGED *et al.*, 2005; MANOLAVA *et al.*, 2008). Esse fenômeno pode ser explicado porque a resposta imune humoral está mais associada com o estímulo de células localizadas nos linfonodos, enquanto que CAAs periféricas têm uma capacidade de estimular mais eficientemente uma resposta imune celular (FOGED *et al.*, 2005; MANOLAVA *et al.*, 2008) e porque partículas de tamanho diferente seguem vias de ingresso intracelular por mecanismos distintos (YAN *et al.*, 2013).

2.6 Nanopartículas como potenciais adjuvantes

Os nanomateriais biocompatíveis exercem um efeito modulador sobre o sistema imunológico e as nanopartículas são consideradas como adjuvantes promissores para o desenvolvimento de vacinas contra infecções e tumores (SMITH *et al.*, 2015; CHO *et al.*, 2011). O termo adjuvante vem do latim *adjuvare* que significa ajudar, portanto essas partículas ou substâncias tem a proposta de

estimular o sistema imune, amplificando ou intensificando a cascata de eventos que levam a produção de anticorpos (SCHIJS, 2000).

Assim, as estratégias mais modernas para despertar uma boa resposta vacinal focam na busca pelo estímulo simultâneo da resposta imune celular e humoral (FOGED *et al.*, 2005; OYEWUMI, KUMAR e CUI, 2010). Neste contexto, adjuvantes contendo material particulado variando entre 50 e 1000nm podem apresentar vantagens competitivas, uma vez que se consegue estimular de forma distinta o sistema imune com um mesmo material (YAN *et al.*, 2013).

Quando incorporado a uma nanopartícula, o antígeno pode encontrar-se disperso no sistema, adsorvido à sua superfície ou mesmo “encapsulado” no interior da partícula (ZHAO *et al.*, 2014), sendo este um dos fatores que interferem na resposta imune gerada pelo sistema, mas que também é influenciado pela velocidade de liberação do antígeno e pelo tipo de resposta inflamatória induzida (OTT E VAN NEST, 2007). Outro fator que interfere positivamente na resposta imune de uma vacina é a densidade de antígenos por unidade de partícula, ou seja, quando normatizada a concentração de antígenos de uma vacina, aquela que apresenta maior taxa de encapsulamento/adsorção desperta uma resposta imune mais protetora (THOMANN-HARWOOD *et al.*, 2013).

Considerando custo e plasticidade para ligações com outras moléculas, nanopartículas poliméricas e metalo/cerâmica apresentam-se como boas candidatas para realização de imunoestimulação (AKAGI *et al.*, 2012; ZHAO *et al.* 2014).

Como exemplo, sistemas nanoparticulados de óxido de zinco demonstraram a capacidade de estimular a imunidade de mucosa vaginal de camundongos expostos ao herpes vírus humano (ANTOINE *et al.*, 2016). Neste experimento, os autores propuseram que a resposta biológica foi melhorada pela associação do vírus à nanopartícula, seguida sua melhor apresentação às células apresentadoras de antígeno e estímulo das células T.

Por sua vez, as nanopartículas de dióxido de titânio apresentam discreta ação oxidante, atuando sobre células dendríticas e células T auxiliares e promovendo imunomodulação (SCHANEM, *et al*, 2013). Experimentalmente, TiO_2 nanométrico foi capaz de induzir a maturação destas células dendríticas favorecendo a polarização da resposta para Th1.

Existem diversos polímeros utilizados para a produção de nanopartículas poliméricas, sendo o poli ácido láctico, o poli ácido láctico-co-glicólico e o poliestireno os mais frequentes descritos na literatura (OHAGAN *et al.*, 2014). Nesta revisão de literatura, os autores relatam que estes polímeros podem ser funcionalizados, promover uma resposta variável celular x humoral e promover respostas do tipo Th₁ e Th₂.

Assim, a combinação de múltiplas nanopartículas, considerando diferentes parâmetros como: compatibilidade do adjuvante com o antígeno, mecanismo de ação, composição quantitativa e qualitativa e características físicas e bioquímicas das partículas podem influenciar fortemente no resultado vacinal (MOTA, *et al*, 2006).

2.7 Raman

A espectroscopia Raman é uma forma altamente específica de espectroscopia vibracional que tem sido rotineiramente utilizada para identificar e quantificar compostos químicos (ERMAKOV *et al*. 2005). É uma técnica baseada no fenômeno de espalhamento de luz decorrente das colisões entre os fótons e moléculas, cujo espectro final pode ser investigado pelo exame das frequências relativas à radiação espalhada pelos grupos funcionais presentes nas estruturas químicas.

A técnica Raman apresenta uma série de vantagens em relação a outras técnicas, tais como: técnica não destrutiva; os espectros podem ser obtidos a partir de soluções aquosas, o que permite obter espectros de organismos vivos sem tratamento prévio; o tamanho do feixe de laser focado possibilita a análise de pequenas quantidades de material ou amostra, incluindo meios heterogêneos. O espectro de Raman pode ser obtido na escala de nanosegundo, ou até mesmo intervalo de picossegundos (BRIDOUX e DELHAYE, 1976) e permitir a caracterização de espécies transitórias, processos fotobiológicos e estados eletrônicos excitados (MERLIN, 1985).

Em estudos biomoleculares, a espectroscopia Raman tem a vantagem de fornecer informações sobre a composição química e a estrutura de moléculas biológicas que variam de acordo com os ácidos nucleicos de cada proteína, bem como lipídios, carboidratos, carotenos, dentre outras substâncias biologicamente ativas. Em estudos microbianos esta abordagem é frequentemente referida como uma impressão digital, já que cada microrganismo pode produzir um espectro único (ASTON *et al*, 2011). Outra importante técnica de realce, em particular para estudos bacterianos é a espectroscopia de Raman Ressonante, que ocorre se o laser incidente está dentro das bandas de absorção molecular de cromóforos (SMITH e DENT, 2005), ocasionando um aumento do sinal por um fator de aproximadamente 10³-10⁵ vezes em relação ao espalhamento convencional, além de reduzir a fluorescência presente nos espectros.

Neste contexto, a análise química não destrutiva da matriz do biofilme de *S. aureus*, incluindo polissacáridos específicos do biofilme, proteínas, microrganismos e bactérias encapsuladas por Raman, mostra-se uma técnica bastante eficiente.

2.8 Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear, RMN, é um método estabelecido em uma variedade de campos científicos, ressaltando química e biologia, de modo que pode ser considerada, atualmente, uma poderosa ferramenta para elucidação da estrutura, dinâmica e interações de macromoléculas biológicas (MARION, 2013).

O fenômeno da RMN pode ser observado quando se incide ondas de rádio-frequência em uma amostra, que tem em sua constituição isótopos com spin nuclear maior que zero, tais como ^1H , ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P ; alinhadas a um campo magnético estático de 5 a 14 mil teslas. Uma vez que seu sinal reflete o ambiente químico em que o núcleo se encontra, esta se mostra uma técnica de grande importância na elucidação estrutural de moléculas pequenas ou de médio peso molecular.

A sequência de carboidratos em um polissacarídeo, a localização e o tipo de ligação glicosídica podem ser determinadas através da correlação entre ^1H - ^{13}C de longa distância, em técnicas de RMN 2D associadas a técnicas de RMN 1D de ^1H e ^{13}C . Assim como a estrutura química, impurezas comuns a este tipo de material podem ser percebidas através desta análise espectroscópica de forma rápida e eficiente (*NMR in biological systems: from molecules to human*).

A técnica de RMN possui ainda uma série de vantagens tais como: rapidez na análise de moléculas menores que 500 Da, capacidade de realizar espectroscopia de RMN em solução permitindo que a estrutura seja analisada sob condições nativas, já que a maioria dos compostos biologicamente ativos são encontrados em meio aquoso; permite obter informações sobre a estereoquímica, ângulos de ligação e distância entre os elementos que compõem as moléculas, dentre outras. Entretanto, torna-se difícil a análise de misturas de produtos, necessitando de prévia purificação e concentração da amostra (LANUCARA *et al.*, 2014).

2.9 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) foi desenvolvida principalmente para estudar células eucarióticas, devido ao seu maior tamanho, em comparação as células procarióticas (HULLET *et al.*, 1969). A CF é uma técnica de análise quantitativa que permite caracterizar uma população celular em escala individual. A medida ocorre no instante em que as células interceptam um feixe de luz e a intensidade dos sinais ópticos gerados pela radiação são, então, correlacionadas com parâmetros estruturais ou funcionais das células (DÍAZ *et al.*, 2009). Esta, é definida como sendo uma técnica citológica avançada utilizada para contar, analisar e classificar partículas microscópicas em suspensão, gerando parâmetros analíticos como tamanho, granulidade e fluorescência das partículas marcadas com fluorocromo (WILKERSON, 2012).

A CF tem a capacidade de medir as características ópticas e de fluorescência de uma única célula ou qualquer outra partícula, tais como microorganismos e núcleos numa corrente de fluido quando passam através de uma fonte de luz (MACEY, 2010).

Segundo descrito por Díaz e colaboradores (2009), um citômetro de fluxo pode ser descrito como um microscópio automático, tendo como vantagem a alta taxa de análise, a precisão e resolução estatística e o curto tempo de resposta.

2.10 Espalhamento dinâmico de luz – DLS

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) é a técnica amplamente utilizada para medidas indiretas de tamanho de partículas de dimensões micrométricas, bem como para mensuração do potencial *Zeta* de partículas. Para isso considera o movimentos browniano das partículas para

calcular o tamanho e a motilidade eletroforética para determinar o potencial *Zeta* (HOO *et al*, 2008).

O potencial *Zeta* é um termo científico para definir o potencial eletrocinético em sistemas coloidais e se refere a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária do fluido ligada à partícula dispersa. Um valor de potencial *Zeta* mais alto (acima de 30mV em módulo) para moléculas e partículas que são suficientemente pequenas, é um forte indicativo de estabilidade coloidal do sistema. Quando o potencial é baixo, a atração excede a repulsão, portanto a dispersão tenderá a “quebrar” ou flocular. (MAN0317 - Zetanosizer, 2004).

REFERÊNCIAS

ABEBE, R.; HATIYA, H.; ABERA, M.; MEGERSA, B.; ASMARE, K.. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **Veterinary Research** v.12:270, 2016

AITKEN, S.L.; CORL, C.M.; SORDILLO, L.M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 291-304, 2011.

AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Adv Polym Sci.* V.247, p. 31-64, 2012

ANTOINE, T. E.; HADIGAL, S. R.; YAKOUB, A. M.; MISHRA, Y.K.; BHATTACHARYA, P.; HADDAD, C.; VALYI-NAGY, T.; ADELUNG, R.; PRABHAKAR, B. S.; SHUKLA, D. Intravaginal zinc oxide tetrapod nanoparticles as immunoprotective agents against genital herpes. **The Jour. of Immun.**v.196 (11), p. 4566-75, 2016

ARAÚJO, G.L. COELHO L. R, CARVALHO CB, MACIEL R.M, CORONADO A. Z., ROZENBAUM R, FERREIRA-CARVALHO B. T, FIGUEIREDO A. M, TEIXEIRA L. A. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **J. Antimicrobiol. Chem.**, v. 57, p. 855-864, 2006.

ASHTON, L.; LAU, K.; WINDER, C. L. GOODACRE, R. Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification, **Future Microbiol.** V. 6(9), p.991-997, 2011

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. – Guttiferae, frente diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.10, n.1, p.64-69, 2008

BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1877-1895, 2006.

- BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 91-100, 1990.
- BOTARO, B. G.; CORTINHAS, C. S.; DIBBERN, A. G.; SILVA, L. F. P.; BENITES, N. R.; SANTOS, M. V. *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. **Trop Anim. Health. Prod.** V.47, p.61-66, 2015
- BRADLEY, A. J.; Bovine mastitis: Na envolving disease. **The veterinarian jornal.** V. 163, p. 1-13, 2002
- BRIDOUX M., DELHAYE M, M. Time resolved and space-rosolved raman spectroscopy **Adv. Infrared Raman Spectrosc.** v. 2, p 140, 1976
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.** v. 57, n. 327, p. 83-88, 2002
- CAFISO, V. *et al.* Agr-genotyping and transcripcional analysis of biofilmproducing *Staphylococcus aureus*. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v.51, p.220-227, Jul. 2007.
- CHO NH, CHEONG TC, MIN JH, WU JH, LEE SJ, KIM D, YANG JS, KIM S, KIM YK, SEONG SY. A multifunctional core-shell nanoparticle for dendritic cellbased cancer immunotherapy. **Nat Nanotechnol.**; v. 6 p.675–82. 2011
- COX, J., COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine** v.15, p.248–256, 1997
- CRAMTON, S. E. *et al.* Anaerobic conditions induce expressions of polysaccharide intercellular adhesin of *Sthaphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4079-85, 2001.
- CUCARELLA, C. *et al.* Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2177-85, 2004.
- DALEY, M. J.; COYLE, P. A.; WILLIAMS, T. J.; FURDA, G.; DOUGHERTY, R.; HAYES, P.W. *Staphylococcus aureus* mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 beta and interleukin-2. **J Dairy Sci.** v.74(12):4413-24. 1991

DÍAZ, M.; HERRERO, M.; GARCIA, L. A.; QUIRÓS, C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 385 – 407, 2010.

DIERLING, A. M. E CUI, Z., Targeting primaquine into liver using chylomicron emulsions for potential vivax malaria therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 303, no. 1-2, pp. 143–152, 2005.

DJABRI, B.; BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. **Veterinary Research**, v. 33, p. 335-7, 2002.

DOBINSKY, S. KATHRIN K, HOLGER R, , KNOBLOCH.-M. K, MATTHIAS A. HORSTKOTTE, DIETRICH M. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. **J Bacteriol.**, v. 185, n. 9, p. 2879-86, 2003.

ERMAKOV, I. V.; SHARIFZADEH, M.; ERMAKOVA, M.; GELLERMANN, W. Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue **J Biomedical Optics**, v. 10 n 6: 064028, 2005

FERNANDES J. B. C., ZANARDO L. G., GALVAO N. N. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. **J Vet Diagn Invest**; V.23:1146–52, 2011

FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H., O'GARA, J.P. a. Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **J. Med. Microbiol.**, v.54, p. 509-10, 2005.

FORGED, C.; BRODIN. B.; FROKJAER, S.; SOUNDBLAD, A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. **Internacional Jour. Of Pharm.** v.298, p.315-322, 2005.

FOX, L. K.; GAY, J. M. Contagious mastites. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** ; v.9(3):475-87, 1993.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo. **Ateneu**, 182 p. 2008.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p. 5577-8891, 2012.

GARRITY, G. M. Bergey's manual of systematic bacteriology: the low G+C gram positives. **New York: Springer-Verlang.**, v.3, 721 p. 2006.

GIERSING, B. K., MODJARRAD, K., KASLOW, D. C., MOORTHY, V. S., Report from the World Health Organization's Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 7-9th sep 2015. **Vaccine**, v.1, 5 p. 2016

GIESE, E. C.; HIROSI, T. SILVA, M. L. C.; SILVA, R.; BARBOSA, A. M. Production, properties and applications of oligosaccharides. **Sem.CiêncAgra Lond** V.32 p.883, 2011.

GIRAUDO, J.A. Conceptos basicos sobre inmunologia de la glandula mamaria y utilización de vacunas contra mastitis. In: VERÍSSIMO, C.J, AMARAL, J.B. **2º Encontro de pesquisadores em mastite bovina do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Zootecnia,. p. 73- 86, 1996.

GOGOI-TIWARI, J.; WILLIAMS, V.; WARYAH, C. B.; CONSTANTINO, P.; AL-SALAMI, H.; MATHAVAN, S.; WELLS, K.; TIWARI, H. K.; HEGDE, H.; ISLOOR, S.; AL-SALAMI, H.; TRILOCHAN, M. Mammary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: A pilot study using non-invasive mouse mastitis model. **Plos One**, 2017.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J. R.; BEURON, D. C.; ARCARI, M. A.; LEE, S. H. I.; MARTINS, C. M. M. R.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; SANTOS, M. V. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium spp.* on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters **The Veter. Jour.** v.209, p.87-92, 2015

GÓRSKA, S.; SANDSTRÖM, C.; WOJAS-TUREK, J.; ROSSOWSKA, J.; PAJTASZ-PIASECKA, E.; BRZOZOWSKA, E.; GAMIAN, A. Structural and immunomodulatory differences among lactobacilli exopolysaccharides isolated from intestines of mice with experimentally induced inflammatory bowel disease. **Sci Rep.** , 6, 37613, 2016

GOTZ, F. Staphylococcus and biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 1367-78, 2002.

GROSS, M.; CRAMTON, S. E.; GOTZ, F.; PESCHEL, A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3423-3426, 2001.

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G.; GOTZ, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 1013-24, 1997.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 815-836, Nov. 2012.

HOO, C. M.; STAROSTIN, N.; WEST, P.; MEXARTNEY, M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **J Nanopart Res.** v. 10. P. 89–96, 2008

HULLET, H.R.; BONNER, W.H.; BARRET, J.; HERZENBER, P. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, v.166, p. 747–749, 1969.

HUSSAIN, M.; HERRMANN, M.; VON EIFF, C.; PERDREAU-REMYNTO, F.; PETERS, G. A 140 KDa extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 519-24, 1997.

JOHNSON, M.; COCKAYNE, M.; WILLIAMS, P.H.; MORRISSEY, J.A. Iron-responsive regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves Fur-dependent and Fur-independent mechanisms. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 8211–8215, 2005.

KANCHAN V, PANDA AK.. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. **Biomaterials**; 28:5344-57, 2007.

KESSEL, K. P. M.; BESTEBROER, J.; STRIJP, J. A. G. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers of immunology**. v.5 – 467 12p, 2014.

KIRK, J.H.; DEGRAVES, F.; TYLER, J. Recent progress in treatment and control of mastitis and control of mastitis en cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 204, n.8, 1994.

KLINGENBERG, C. Coagulase-Negative staphylococcal sepsis in neonates: Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, p. 817-22, 2005.

KNOBLOCH, J.K.; JAGER, S.; HORSTKOTTE, M. A.; ROHDE, H.; MACK, D. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene ica **R. Infect. Immun.**, v. 72, n. 7, p. 3838-48, 2004.

KRUTH, H., CHANG, J., IFRIM, I., ZHANG, W-Y. Characterization of patocytosis: endocytosis into macrophage surface-connected compartments. **Eur J Cell Biol.**; v.78,p91–99, 1999

KUBOTA, Y.; TAKAHASHI, S.; MATSUOKA, O. Dependence on particle size in the phagocytosis of latex particles by rabbit alveolar macrophages cultured in vitro **J. Toxicol. Sci.** v.8, 189–195, 1983

LANDIN, H. MÖRK, M. J.; LARSSON, M.; WALLER, K. P. Vaccinations against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. **Acta Vet. Scand** v.57, p.81, 2015

LANUCARA. F.; HOLMAN, S. W.; GRAY C. J.; EYERS, C. E. . The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. **Nature Chemistry**, v.6, p.281–294, 2014.

MACEY M. G. Principles of flow cytometry. Flow cytometry: principles and applications In: Macey MG, ed. Totowa (NJ): **Humana Press**,p. 1–15. 2010.

MAIRA-LITRÁN, T.A. *et al.* Immunochemical properties of staphylococcal poly n-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4433-4440, 2002.

- MAIRA-LITRÁN, T.; KROPEC, A. GOLDMANN, D. A.; PIER, G.B. Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated staphylococcal poly-n-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. **Infection and immunity**. v.73 (10), p.6752-6762, 2005
- MAN0317 - Zeta sizer Nano Series, **User Manual**, Issue 1.1 Feb. 2004
- MANOLOVA, V., FLACE, A., BAUER, M., SCHWARZ, K., SAUDAN, P. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European journal of immunology** v.38, p.1404–1413, 2008
- MARION, D. An introduction to biological NMR spectroscopy, **Mol Cell Proteomics**. v. 11, p. 3006-25. 2013.
- MARQUES, V. F., SOUZA, M. M.S. DE, MENDONÇA, E. C.L. DE, ALENCAR, T. A., PRIBUL, B. R; COELHO, S. M. O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E. B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus spp.* e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33(2),p. 161-170. 2013.
- MELLO, P. L.; AGOSTINIS, R. O.; BARZON, E. M.; COLOMBO, R. B.; SILVA, A. V.; MARTINS, L. A. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do paraná. **Vet e Zoot**. v.19(4), p. 513-521. 2012.
- MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias**, v.5, n.1, p.107- 118, 1999
- MERLIN, J. C. Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid containing systems **Pure and Appl. Chem**. Vol. 57, No. 5, pp. 785-792, 1985.
- MOON, J. J., SUH H.; LI, A. V.; OCKENHOUSE, C. F.; YADAVA A.; IRVINE, D. J. Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V.109(4), p. 1080-1085, 2012
- MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal** v.16(2), p 79-88, 2006.

NIKONENKO, B; REDDY, V. M., BOGATCHEVA, E.; PROTOPOPOVA, M.; EINCK, L.; NACY, C. A. Therapeutic Efficacy of SQ641-NE against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.58 (1) p. 587–589, 2014.

NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A.; KOSKELA, A.; OHMAN, L.; SODERQUIST, B. Characterization of coagulase-negative in staphylococci isolated from patients with infected hip prostheses: use of phenotypic and genotyping analyses, including tests for the presence of the ica operon. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, p. 255-265, 2007.

O'HAGAN, D. T.; MacKICHAN, M. L.; SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 69-85, 2001.

OTTO M. Staphylococcal biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol** v.322, p.207–228. 2008

OYEWUMI, M. O.; KUMAR, A.; CUI, Z.; Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. **Expert Review Vaccines**, v. 9, n.9, p. 1095-1107, 2010.

PEREIRA, U.P.; OLIVEIRA, D.G.S.; MESQUITA, L.R.; COSTA, G.M.; PEREIRA, L.J. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. **Veterinary Microbiology**, v. 148, p. 117-124, 2011.

PEREZ, M. M. PRENAFETA, A.; VELLE, J.; PENADÉS, J.; ROTA. C.; SOLANO, C.; MARCO. J.; GRILLÓ, M. J.; LASA. I.; MAIRA-LITRAN.T.; JIMÉNEZ-BARBERO. J.; COSTA. L.; PIER. G. B.; ANDRÉS. D.; AMORENA.B. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. **Vaccine**. V.27 p.2379-2386, 2009.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C.; Mastitis counter attack. Naperville: Babson bros, 150p, 1991.

QUINN, P. J. *et al.* **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2 nd ed. New York: J. Wiley. 400 p. 2011

RODRIGUES, J., SILVA, R. D., NORONHA, H., PEDRAS, A., GEROS, H., CÔRTE-REAL, M. Flow cytometry as a novel tool for structural and functional

characterization of isolated yeast vacuoles. **Microbiology**, v159, p. 848-856, 2013.

SADOWSKA B, WIĘCKOWSKA-SZAKIEL M.; PASZKIEWICZ M.; RÓŻALSKA B. The immunomodulatory activity of *Staphylococcus aureus* products derived from biofilm and planktonic cultures. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. V.61 (5):413-20, 2013

SAGINUR, R. *et al.* Multiple Combination Bactericidal Testing of Staphylococcal Biofilms from Implant-Associated Infections. **Antimicrobial. Ag. Chemother.**, v. 50 , n. 1, p. 55–61, 2006.

SAKWINSKA, O., GIDDY, K., MOREILLON, M., MORISSET, D., WALDVOGEL, A., MOREILLON, P. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. **Appl and Envir Mic**. V.77-17, p 5908-5915, 2011

SANKAR, P. New therapeutic strategies to control and treatment of bovine mastites. **Veter medicine**. V 1, p.7-8. 2016

SALGADO-PABÓN, W., CASE-COOK, L. C., SCHLIEVERT, P. M., Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* superantigens. **Methods Mol Biol**, v.10, p 169-185, 2014

SANTEMA, W.; HENSEN, S. RUTTEN, V. KOETS, A. Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis **Vaccine**. V. 27 p 2312-23-19. 2009

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. **1ºed. Barueri: Manole.**, p.314. 2007

SCHANEM, B. C.; DAS, S.; REILLY, C. M.; WARREN, W. L.; SELF, W. T.; SEAL, S.; DRAKE, D. R. Immunomodulation and T helper Th1/Th2 response polarization by CeO₂ and TiO₂ nanoparticles. **Plos One**. V.8 n5, 2013

SCHINJS, V.E.J.C. Immunological Concepts of Vaccine Adjuvant activity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 456-463, 2000.

SHANKS, R. M. *et al.* Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4596–4606, 2005.

SMITH JD, MORTON LD, ULERY BD. Nanoparticles as synthetic vaccines. **Curr Opin Biotechnol.**; v.34, p.217–24. 2015

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental mastites. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** V.9 (3):489-98. 1993

SMITH, E.; DENT, G. Modern Raman Spectroscopy: a practical approach. John Wiley and Sons, **West Sussex**, UK, 2005

SOUZA, G. N. Mastite e Instrução normativa 51. **Anais simpósio de qualidade do leite derivados.**UFRRJ v.1, 22p. 2010

STOODLEY, L., STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends. Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 7-10, 2005.

STOODLEY, L.H.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews – Microbiology**, London, v.2, p.95-108, 2004.

SWARTZ, M. A. The physiology of the lymphatic system. **Adv Drug Deliv Rev.**; 50:3–20, 2001.

TAKASAKI, J. *et al.* Molecular characterization of an atl null mutant of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Immunol.**, v.46, p. 601-12, 2002.

TAPONEN, S.; JANTUNEN, A.; PYÖRÄLÄ, E.; PYÖRÄLÄ, S. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, p. 53-62, 2003.

THOMANN-HARWOOD L.J., KAEUPER P., ROSSI N., MILONA P., HERRMANN B., MCCULLOUGH K.C. Nanogel vaccines targeting dendritic cells: Contributions of the surface decoration and vaccine cargo on cell targeting and activation. **J. Control. Release.** v.166 (2) p.95-105, 2013;

THOMAS, S. N.; SCHUDEL, A. Overcoming transport barriers for interstitial-, lymphatic-, and lymph node-targeted drug delivery. **Curr Opin Chem Eng.** ; v.7: p.65–74. 2015.

TORMO, M. A.; KNECHT, E. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiol.**, v. 151, p. 2465-75, 2005.

VAN BALLEEN, P., SIMON, A. P., HEIJS, L. Mismatched HLA-DRB3 can induce a potent response after HLA 10/10 matched stem cell transplantation. **Transplantation**, v3, p 1534-1543, 2017.

VALLE, J. *et al.* SarA and not o-B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol.**, v. 48, p. 1075-1087, 2003.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes. Infect.**, v. 4, p. 481-9, 2002.

WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41- 68, 1988.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**. 2017

WILKERSON, M. J. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.42, p.53–71. 2012.

WILSON, D.J.; GROHN, Y.T.; BENNETT, G.J. Comparison of J5 vaccines and Controls for incidence, etiologic agent, clinical severity, and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. **J. Dairy. Sci.** v.90, p. 4282-4288, 2007.

XU, A.; YAO, M.; XU, G.; YING, J.; MA, W.; LI, B.; JIN, Y. A physical model for the size-dependent cellular uptake of nanoparticles modified with cationic surfactants. **Int. J. Nanomed.** V.7, p.3547-3554, 2012

YAN, S. GU, W.; XU, Z. P., Re-considering how particle size and other properties of antigen-adjuvant complexes impact on the immune responses **Journal of Colloid and Interface Science** v.395, p.1–10, 2013

YIP, H.C., KARULIN, A.Y., TARY-LEHMANN, M., HESSE, M.D., RADEKE, H., HEEGER, P.S., TREZZA, R.P., HEINZEL, F.P., FORSTHUBER, T., LEHMANN, P.V. Adjuvant-guided type-1 and type-

immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response. **J. Immunol.** V.162, 3942– 3949, 1999

ZHAO, C.; CHENG, H.; JIANG, P.; YAO, Y.; HAN, J. Preparation of lutein-loaded particles for improving solubility and stability by Polyvinylpyrrolidone (PVP) as an emulsion-stabilizer. **Food chem.** V.156 P.123-128, 2014

ZHAO, L.; SETH, A.; WIBOWO, N.; ZHAO, C-X.; MITTER, N.; YU, C.; MIDDELBERG, A. P. J. Nanoparticles vaccines. **Vaccine.** V.32, p. 327-337, 2014

ZIEBUHR, W.; LÖSSNER, I.; RACHID, S.; DIETRICH, K.; GÖTZ, F.; HACKER, J. Modulation of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. Analysis of genetic mechanisms. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 485, p. 151-7, 2000.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS
PARA CARACTERIZAÇÃO DO POLI-N-
ACETILGLUCOSAMINA EXTRAÍDOS DE *Staphylococcus
aureus***Cynthia Penoni Volpi Abreu¹Camila Guimarães de Almeida²Alessandro de Sá Guimarães³Raimundo Vicente de Sousa⁴Luiz Fernando Cappa de Oliveira⁵Wanessa Araujo Carvalho³Humberto de Mello Brandão³**Artigo formatado de acordo com a norma da ABNT**

¹ (Médica Veterinária, Mestrado em Ciências veterinárias- UFLA)

² (Química, Doutora em Química, Pós doutoranda - UFOP)

³ (Médico Veterinário, Pesquisador Embrapa Gado de Leite)

⁴ (Médico Veterinário, Doutor, Professor Universidade Federal de Lavras)

⁵ (Químico, Doutor, Professor Universidade Federal de Juiz de Fora)

RESUMO

A mastite é uma das principais doenças que acomete os rebanhos leiteiros mundialmente, e tem como principal agente etiológico o *Staphylococcus aureus*; que recentemente entrou para a lista da Organização mundial de saúde como uma das 12 bactérias multirresistentes que representam as maiores ameaças para a saúde e, portanto, necessitam de amplo esforço de pesquisa e desenvolvimento para novos medicamentos e vacinas mais eficazes. Um importante fator de virulência produzido por esta bactéria é o biofilme, que tem como principal componente o poli-*N*-acetilglicosamina (PNAG). Dessa forma, o presente trabalho propõe o estudo por espectroscopia vibracional do PNAG de *S. aureus* e sua aplicação como alternativa não destrutiva para determinação do grau de desacetilação deste polímero, bem como avaliação da toxicidade celular. A caracterização do polissacarídeo foi realizada pelos métodos de ressonância magnética nuclear, raman, infravermelho e espalhamento de luz dinâmico. Testes biológicos foram realizados com células mononucleares de sangue periférico bovino para avaliar a toxicidade aguda do composto. O PNAG mostrou-se tóxico apenas para linfócitos na maior concentração testada (7,5mg/mL) sugerindo assim que quanto maior o grau de desacetilação maior será a taxa de fagocitose. Este é um estudo com potencial aplicação para o desenvolvimento de imunoestimuladores para o tratamento da mastite bovina.

Palavras-chave: Mastite, *S. aureus*, PNAG, imunoestimulador

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é uma das 12 bactérias que compõe a lista da *World Health Organization* com bactérias multirresistentes que representam as maiores ameaças para a saúde humana e, portanto, necessitam de amplo esforço de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos (WILLYARD, 2017) e de vacinas mais eficazes (SALGADO-PABÓN et al, 2014). Por possuir grande variação de hospedeiros e elevada possibilidade de emergência de estirpes bacterianas com adaptação interespécies o *S. aureus* também possui grande importância na saúde animal (SAKWINSKA et al., 2011; VAN BALEN et al., 2017).

O biofilme é um importante fator de virulência do *S. aureus* associado à persistência de infecção, ao retardo da fagocitose, à resistência aos antimicrobianos e a persistência do patógeno no ambiente (STOODLEY et al., 2004). Assim, o biofilme se tornou importante alvo de pesquisa para desenvolvimento de novas vacinas (GIERSING et al.; 2016) e de medicamentos para controlar infecções causadas por *S. aureus*.

O principal componente do biofilme do *S. aureus* é um exopolissacarídeo formado por Poli-N-acetilglucosaminas (PNAG) que, quando parcialmente desacetilado recebe o nome de adesina polissacarídica intercelular (PIA), assim PIA pode ser considerado um sinônimo de PNAG (ARCIOLA et al., 2015). A desacetilação do PNAG faz com que a cadeia polimérica fique parcialmente protonada em ambientes neutros e ácidos, aumentando a estabilidade do biofilme por favorecer a interligação das células bacterianas (OTTO, 2008) e com outras superfícies negativas, como exemplo, células e biomateriais (STOODLEY et al., 2004). Adicionalmente, PNAG desacetilados são mais imunogênicos e conseguem estimular respostas protetoras contra proteínas não relacionadas ao *S. aureus* (MAIRA-LITRAN et al., 2005).

Considerando que grau de desacetilação do PNAG/PIA nativo é fortemente influenciado pela variabilidade genética do *S. aureus* e por variações no meio em que a bactéria se encontra (MAIRA-LITRAN *et al.*, 2005) a determinação do grau de desacetilação da cadeia polimérica do PNAG/PIA é importante para sua aplicação biotecnológica e em estudos de patogênese, de imunologia e de resistência antimicrobiana associados as *S. aureus*.

Diante da importância biológica e química a presença de grupamentos amina livres em carboidratos poliméricos, atualmente várias técnicas tem sido descritas para a determinação do grau de desacetilação. Dentre estas, encontram-se a titulação condutimétrica, um método simples que requer poucos reagentes e equipamentos de baixo custo. Entretanto, para obter resultados confiáveis por esta técnica, torna-se necessário que o polímero tenha solubilidade adequada, tenha sido adequadamente purificado e seco, o que torna este método algumas vezes inviável (BALÁZS e SIPOS, 2007). Outra técnica que pode ser utilizada é a calorimetria exploratória diferencial (DSC), que se mostra eficiente mesmo com amostras impuras, mas a qualidade dos resultados obtidos é altamente dependente de experimentos prévios para determinação de curva de calibração (GUINESI e CAVALHEIRO, 2006).

Utilizando ressonância magnética nuclear Joyce e colaboradores (2003), identificaram a estrutura química do PNAG/PIA produzidos por *S. aureus* utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear 1D e 2D. Apesar da alta eficiência desta técnica espectroscópica para elucidação estrutural, a mesma mostra-se de elevado custo, tanto na manutenção do aparelho quanto no momento da análise, uma vez que há a necessidade de solventes especiais e uma prévia purificação da amostra para facilitar a interpretação dos espectros.

Há algum tempo, as técnicas de espectroscopia vibracional de reflexão total atenuada no infravermelho (FT-ATR) e Raman, vem sendo muito utilizadas para a caracterização de amostras das mais variadas composições químicas. Sua

vantagem em relação a outras técnicas está relacionada ao caráter não destrutivo, a rápida aquisição de dados, a possibilidade de análise micrométrica e a necessidade de pouco ou nenhum tratamento prévio da amostra a ser analisada. Estudos microbianos com esta abordagem é frequentemente referido como a obtenção de uma impressão digital da amostra, já que cada diferente microrganismo pode produzir um espectro único (ASHTON et al, 2011). Uma vez que a espectroscopia Raman e no infravermelho estão baseadas em fenômenos físicos diferentes essas técnicas podem se complementar, levando a obtenção de dados importantes para elucidação da estrutura química de compostos biológicos. Dessa forma, o presente trabalho propõe o estudo por espectroscopia vibracional do PNAG de *S. aureus* e sua aplicação como alternativa não destrutiva para determinação do grau de desacetilação deste polímero, bem como avaliação da toxicidade celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo de bactérias

Foi utilizada a estirpe 2309 de *Staphylococcus aureus* isolada de mastite bovina, pertencente a Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária, da Embrapa Gado de Leite, sediada em Juiz de Fora, Minas Gerais. Esta cepa de *S. aureus* já é sabidamente alta produtora de biofilme de acordo com experimentos realizado por Salimena e colaboradores (2016) no laboratório de microbiologia do leite da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

O cultivo foi realizado em ágar BHI (*Brain Heart Infusion Agar*, Himedia, Mumbai, Índia) em placas descartáveis para o crescimento bacteriano por 24 horas a 37°C em estufa.

2.2 Produção, extração e purificação do exopolissacarídeo

Foi preparado um inóculo contendo uma alçada da cepa de interesse em caldo TSB (Trypticasein Soja Broth, Becton Dickinson France SA), mantido sob agitação por 30 segundos para homogeneizar. Então foi adicionada uma alíquota de 0,5mL do inóculo em 100mL de caldo TSB em garrafas *roux* com o auxílio de pipeta de vidro estéril. As garrafas foram acondicionadas em estufa a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas para o crescimento bacteriano e formação do biofilme.

O processo de extração e purificação do biofilme foi adaptado de Bales e colaboradores (2013). Após formação do exopolissacarídeo, as colônias de *S. aureus* foram submetidas a inativação térmica à 60°C por 90 min., e seguidas de três lavagens sucessivas com 30mL NaCl (0,9%) para a retirada total do sobrenadante. A remoção mecânica do biofilme foi realizada com pérolas de vidro e aos 30ml de extrato foram adicionados 12mL de NaOH 1M. Após 3 horas de incubação à 20° a amostra foi centrifugada a $16800\times\text{G}$ por 60 minutos e o sobrenadante foi dialisado a por 24 horas em membrana MWCO 12-14KDa (Sigma-Aldrich).

Ao material dialisado adicionou-se 10%p/v de ácido tricloroacético, incubou-se por 30 minutos e centrifugou a $16800\times\text{G}$ por 60 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 1,5vol de etanol puro e acondicionado a 4°C por 24 horas, seguido de nova centrifugação a $16800\times\text{G}$ por 60 minutos e remoção do sobrenadante. O corpo de fundo foi ressuspenso em água ultrapura e submetido a diálise em membrana MWCO 12-14KDa (Sigma-Aldrich) por 24 horas. O material dialisado foi filtrado em membrana de nylon $0,22\mu\text{m}$ e liofilizado

2.3 Desacetilação do polímero

Para remover os substituintes ligados ao nitrogênio foi seguido protocolo usado por Joyce e colaboradores (2003). O polímero purificado foi dissolvido a 4mg/mL de NaOH 5N e incubado sob ambiente de nitrogênio durante 20 horas a 37°C. A mistura foi resfriada até 10°C em banho de gelo e neutralizada por adição lenta de HCl 5N, também em gelo. A reação foi concentrada utilizando uma membrana MWCO Sigma-Aldrich de 12-14 kDa durante três dias a 4°C e o remanescente foi liofilizado durante 48 horas.

2.4 Espectroscopia infravermelha transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos com um espectrômetro ALPHA FT-IR Bruker na região de 4000-600 cm^{-1} . O método de reflexão total atenuada (ATR) foi aplicado para as medições com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans.

2.5 Espectroscopia Raman

As medições de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100 excitado com um laser $\text{Nd}^{+3}/\text{YAG}$ operando a 1064nm, equipado com um detector InGaAs arrefecido com azoto líquido. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm^{-1} . Uma média de 2000 varreduras foram coletadas com uma potência de laser de 60Mw.

2.6 Determinação da massa molecular, tamanho e potencial zeta (DLS)

As análises de massa molecular, tamanho e potencial zeta foram realizadas utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano-ZS com comprimento de onda de laser em 633nm (laser de 4mW He-Ne) e um termostato

com estabilização de temperatura. Utilizou-se uma cela de vidro quadrada padrão com um volume de 4,5mL para leitura da massa molecular e cela de policarbonato com eletrodos de ouro banhados a berílio/cobre, volume de 1 mL. As amostras foram medidas a 25,2°C e a dispersão de luz foi detectada a 90°.

2.7 Coleta e cultivo de células mononucleares de bovinos

A coleta do sangue dos animais foi realizada no Campo Experimental José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco – MG seguindo toda assepsia adequada para tal manejo. Foram coletados 30mL de sangue de um bovino, fêmea, mestiço.

Para isolamento das células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell* – PBMC) foi seguido protocolo adaptado de Saldarriaga (2003) onde prevê a inicial centrifugação do sangue em tubos com EDTA a 300xG por 10 minutos. Foi coletada a placa leuco-plaquetária com auxílio de micropipeta e transferência para um tubo de 15mL. Adicionou-se tampão fosfato salino (PBS) na proporção de 1 parte da camada leuco-plaquetária para uma parte de PBS, e em seguida sobrepôs-se cada 4mL de amostra com 3 mL de Ficoll Paque PLUS e centrifugou-se por 40 min a 400xG. As células mononucleares foram lavadas e centrifugadas a 100xG por mais duas vezes com PBS. Ressuspendeu-se em meio de cultura DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 10mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico. Foram plaqueadas 3×10^5 células viáveis por poço, em placas de 24 poços.

2.8 Ensaio de citotoxicidade aguda

Para preparar as células para o ensaio, foi adicionado 1mL de meio DMEN contendo as formulações com o polímero puro e desacetilado, por poço em placas de cultivo celular de 24 poços. O ensaio foi realizado em 24 horas de incubação em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACS Scalibur BD após 24 horas da incubação.

2.9 Análise estatística dos dados

Para a análise dos dados foi utilizado o software SAS e aplicados os testes de ANOVA e Teste de Dunnet para comparação das médias de mortalidade das células entre os tratamentos de interesse.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos Polímeros

Este é o primeiro trabalho que descreve as bandas espectrais Raman e da região do infravermelho típicas do Poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG) de *S. aureus*. Para este propósito, comparou-se o espectro Raman da colônia bactéria com o extrato bruto de biofilme (Figura 1), onde verificou-se a ausência da banda em 822 cm⁻¹, no espectro do extrato bruto de biofilme, atribuída ao $\nu(\text{O-P-O})$ da molécula ácidos nucleicos (MAQUELIN *et al*, 2002; RAMYA *et al*, 2010), indicando que o processo de lise e remoção do conteúdo celular solúvel em água foi eficiente. No entanto, em ambos os espectros, ainda foi possível verificar a presença das biomoléculas como: carboidratos, lipídios e proteínas. Os lipídios podem ser identificados devido a presença das bandas nas regiões 3060, 1660 e

1450 cm^{-1} , características desta classe de substâncias atribuídas respectivamente ao $\nu(\text{C-H})$, $\nu(\text{C=C})$ e $\delta(\text{CH}_2)$ (GIERLINGER *et al*, 2006; SCHULZ *et al*, 2005). A identificação das proteínas e carboidratos pode ser comprovada pela presença de bandas referentes ao grupo amida e amina, pelas bandas em 1620, 1572, 1340 cm^{-1} , atribuídas respectivamente ao $\nu(\text{C=O})$ em amida, $\delta(\text{NH}_2)$ em amina e $\delta(\text{N-H})/\nu(\text{C-N})$ (LAUCKS *et al*, 2005; LITVINOV *et al*, 2012), que estão presentes na estrutura química dessas duas biomoléculas. Esses resultados indicaram que tanto na colônia de *S. aureus* quanto no extrato bruto de biofilme foi possível identificar a presença de proteínas, carboidratos e lipídios.

Nos espectros do extrato bruto biofilme e do PNAG nativo verificou-se a presença da banda em 1381 cm^{-1} , característica do estiramento simétrico do grupamento COO^- , presente na estrutura dos polissacarídeos (IVLEVA *et al*, 2009). Além desta, no espectro do extrato bruto de biofilme, notaram-se também as bandas em 1504, 1320, 1035, 943 e 860 cm^{-1} atribuídas respectivamente aos modos vibracionais, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$, $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-C})/\delta(\text{C-OH})$, $\nu(\text{O-CH}_3)$ e $\nu(\text{C-O-C})$ da ligação glicosídica, presentes na estrutura química dos polissacarídeos (IVLEVA *et al*, 2009; PELTON *et al*, 2000). Por sua vez, no PNAG nativo também pôde-se observar a presença de bandas características de polissacarídeos, em 1467, 945 e 288 cm^{-1} , atribuídas respectivamente aos modos vibracionais $\delta(\text{CH}_2)$; $\delta(\text{C-O-C})$ da ligação 1,6-glicosídica e $\delta(\text{C-NH-C})/\gamma(\text{OH})$, respectivamente. Notou-se ainda, bandas em 1127/1095, 738, 687 e 434 cm^{-1} atribuídas respectivamente aos modos $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-C})/\delta(\text{C-O-H})$, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{COO}^-)$ e $\delta(\text{C-C-O})/\delta(\text{C-C-C})$ presentes na estrutura química do anel glicosídico (ALMEIDA *et al*, 2010). Em espectroscopia Raman, a presença de diferentes bandas atribuídas a mesma substância é explicada pelas diferentes interações dos componentes da amostra (IVLEVA *et al*, 2009), aqui resquícios de proteínas, lipídios ou outros carboidratos que não o PNAG presentes no extrato bruto de biofilme.

Após a purificação do extrato de biofilme bruto, no PNAG nativo, podemos notar a diminuição da intensidade relativa da banda em 2911 cm^{-1} , atribuída ao $\nu(\text{C-H})$, característico dos lipídios e proteínas (DYBAS *et al.*, 2016). Considerando a perda da banda 822 cm^{-1} na etapa inicial de purificação do PNAG nativo e a redução da intensidade relativa da banda em 2911 cm^{-1} , pode-se inferir que o processo de purificação do PNAG nativo conseguiu remover ácidos nucleicos, lipídios e proteínas.

Para demonstrar que as técnicas de espectroscopia vibracionais podem ser utilizadas para avaliar o grau de desacetilação do PNAG nativo, foi desacetilado o mesmo polímero utilizado no experimento (PNAGd). O espectro Raman do PNAGd (Figura 1), diferentemente do espectro do PNAG nativo, há a presença de uma banda intensa em 1081 cm^{-1} . Esta banda pode ser atribuída aos modos vibracionais $\nu(\text{C-O-C})/\nu(\text{C-OH})/\nu(\text{C-C})$ (RAMYA *et al.*, 2010). Esse fato indica que o processo de desacetilação além de alterar os modos vibracionais relacionados com o grupamento amina, também alterou os modos vibracionais da estrutura polimérica, a qual não foi diretamente modificada pelo processo de desacetilação. Este fenômeno pode ser explicado por uma variação no grau de cristalinidade do PNAGd, reduzindo a intensidade de algumas bandas.

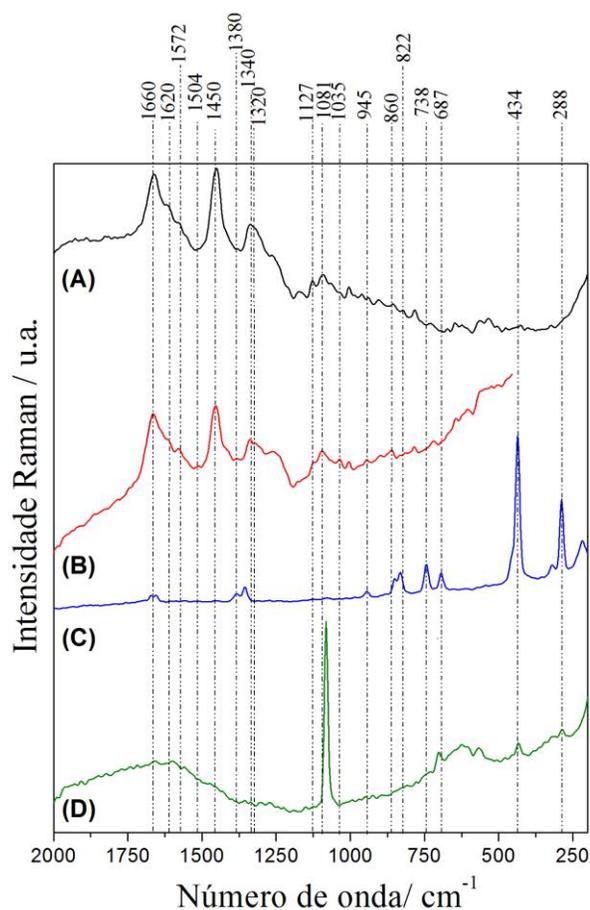


Figura 1. Espectro na região do Raman de (A) Colônia bacteriana ; (B) Extrato bruto biofilme; (C) PNAG nativo e (D) PNAG desacetilado.

Não foi possível gerar o espectro de absorção no infravermelho das colônias de *S. aureus* com qualidade, isso ocorreu em função da grande quantidade de umidade presente na amostra. A figura 2 mostra o espectro de absorção no infravermelho das amostras de extrato bruto de biofilme, PNAG nativo e PNAGd. Pode-se identificar no espectro do extrato bruto de biofilme a presença de bandas nas regiões entre 3600-3150 e 2963-2914, as quais são

atribuídas aos modos vibracionais $\nu(\text{NH}_2)/\nu(\text{OH})$ e ao $\nu\text{CH}_3/\nu\text{CH}_2$ e a presença das bandas em 1639, 1534 e 1223 cm^{-1} , atribuídas respectivamente aos modos de $\nu(\text{C=O})/\nu(\text{C-N})$ (amida I), a $\delta(\text{NH})/\nu(\text{C-N})$ (amida II) e $\nu(\text{C-N})$ (amida III) (ABDOLI *et al.*, 2016; PELTRE *et al.*, 2017). Essas bandas estão associadas às amidas secundárias presentes tanto em proteínas quanto em glicosídeos acetilados (ABDOLI *et al.*, 2016). Por sua vez, as bandas em 1398 e 1061 cm^{-1} no espectro do biofilme podem ser atribuídas ao $\nu(\text{COO}^-)$ (PELTRE *et al.*, 2017) e ao $\nu(\text{O-C-O})$ do glicopeptídeo ribose (ABDOLI *et al.*, 2016).

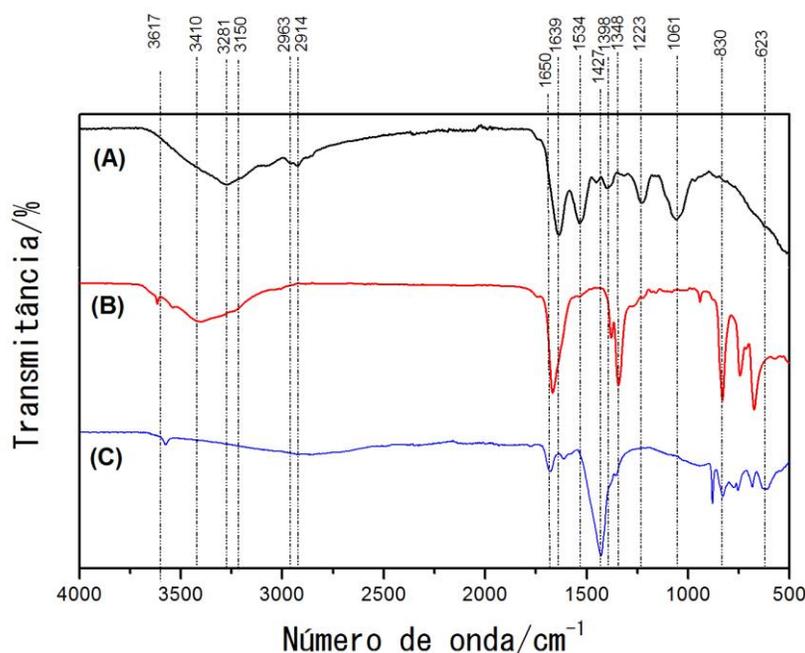


Figura 2. Espectro Infravermelho de (A) Extrato bruto biofilme; (B) PNAG nativo e (C) PNAG desacetilado

Especificamente no PNAG nativo, observou-se a presença das bandas em 1379 e 1348 cm^{-1} , atribuídas respectivamente a $\delta(\text{CH}_3)$ no grupo NHCOCH_3

e $\delta(\text{CH})$ do anel glicosídico (ZVEZDOVA, 2010). Comparando os espectros de absorção no infravermelho do extrato bruto de biofilme, PNAG nativo e PNAGd é possível identificar algumas alterações espectrais. A banda em 1061 cm^{-1} não está presente nos espectros do PNAG nativo e PNAGd, o que indica que a ribose não constitui a estrutura do PNAG nativo e que a mesma foi retirada durante o processo de purificação. Ocorre, ainda, a diminuição da intensidade banda em 1223 cm^{-1} no espectro do PNAG nativo e sua ausência no espectro do PNAGd, indicando que esse o processo de extração e purificação eliminou peptídeos ou proteínas que poderiam ser responsáveis pela intensidade relativa desta banda. Assim, mesmo que pequena, intensidade relativa dessa banda presente no espectro do PNAG nativo é devido a presença de grupamentos amidas na sua estrutura. No entanto, a ausência desta banda no espectro do PNAGd está relacionada com o processo de desacetilação que transforma grupamentos amidas em amina (ZVEZDOVA, 2010).

A presença da banda em 1379 cm^{-1} , no espectro do PNAG nativo está relacionada com o grupamento metil ligado à amida, no entanto, essa banda não está presente no espectro de infravermelho do PNAGd, no qual observou-se uma banda em 1427 cm^{-1} , atribuída a $\delta(\text{NH}_2)$ (BONNIN *et al*, 1999). Esse fato está relacionado ao processo de desacetilação e ao aumento de grupamentos aminas na cadeia polimérica do PNAGd. Também como consequência da diminuição dos grupamentos amida da estrutura química do PNAG nativo, foi possível verificar a diminuição da intensidade relativa da banda em torno de 1650 e 1534 cm^{-1} . Por fim, verificou-se a presença da banda em 830 cm^{-1} , no espectro do PNAG e PNAGd, atribuídas à vibração do anel glicosídico e a presença da banda em 623 cm^{-1} , no espectro do PNAG nativo a qual pode ser atribuída a $\delta(\text{NH}_2)$ (ZVEZDOVA, 2010).

Para confirmar a natureza química do PNAG (*i.e.* *N*-acetil- β -(1 \rightarrow 6)-glucosamina), sua pureza e o sucesso no processo de desacetilação do PNAG

nativo, realizou-se a análise ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D (Figuras 3, 4 e 5).

Os espectros de RMN 1D e 2D obtidos das amostras de PNAG nativo e PNAGd são semelhantes aos descritos por Joyce e colaboradores (2003). No espectro de RMN de ^1H pôde-se observar um sinal em δ 2,08 referente ao grupo $\text{CH}_3\text{CO}-$; multipletos na região de δ 3,47-4,54 atribuídos aos hidrogênios do anel N -glicosídico e um sinal em δ 6,16 que pode ser atribuído aos hidrogênios do grupo GlcNH_3^+ . A presença do hidrogênio anomérico em campo mais alto e a elevada constante de acoplamento ($J = 5,2$ Hz) caracterizaram a configuração β para o polímero em questão. No RMN de ^{13}C notaram-se sinais na região de δ 58,1- 95,8 associados aos carbonos do anel N -glicosídico, bem como, em δ 19,9 e δ 166,2-167,1 sinais referentes aos carbonos metila e carboxílico do grupo acetil. Todos as atribuições puderam ser confirmadas pelo espectro de RMN 2D- HSQC.

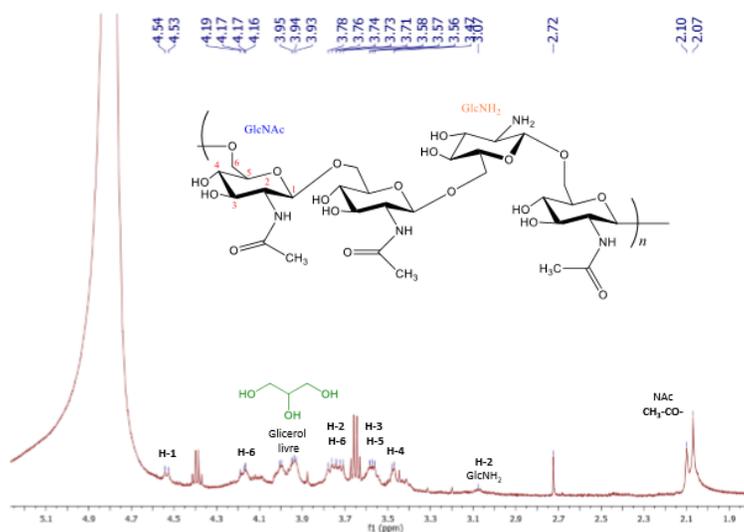


Figura 3: Espectro de RMN de ^1H do biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* (D_2O 500 MHz)

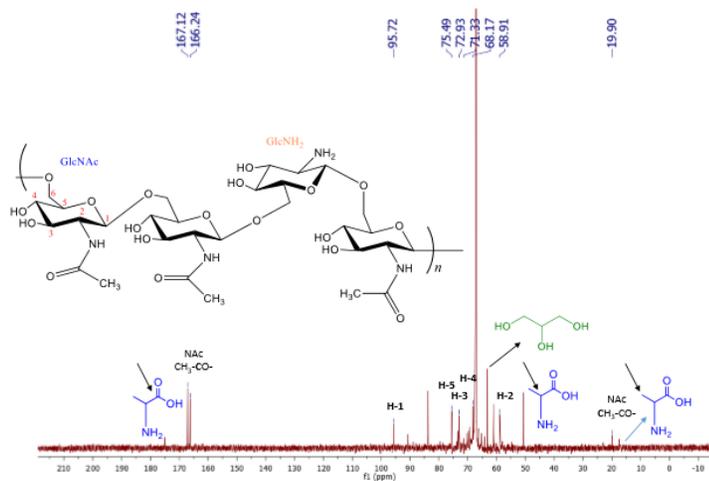


Figura 4: Espectro de RMN de ^{13}C do biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* (D_2O 125 MHz)

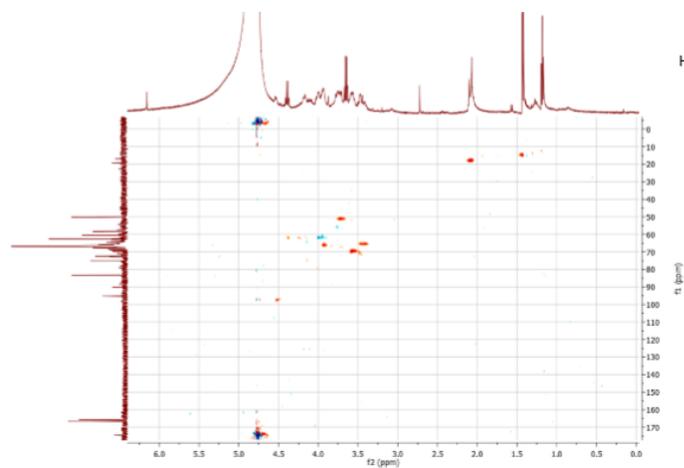


Figura 3. Espectro de RMN 2 D - HSQC do biofilme produzido por SAE (D_2O , 500 MHz).

Figura 5: Espectro de RMN de ^2D - HSQC do biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* (D_2O 500 MHz)

Assim, o resultado obtido pela análise RMN reforça a descrição das bandas espectrais Raman e da região do infravermelho típicas do Poli-N-acetilglucosamina (PNAG) de *S. aureus*. Dessa forma, a convergência de resultados entre as técnicas analíticas empregadas, nos permitiu efetuar o cálculo do grau de desacetilação tanto do PNAG nativo quanto do PNAGd utilizando o métodos já descritos na literatura (ZAJAC *et al.*, 2015; MANSUR *et al.*, 2015). Assim, grau de desacetilação obtido a partir dos espectros de RMN de ¹H, Raman e infravermelho foram respectivamente de 66%, 60% e 55% para o PNAG nativo, enquanto para o PNAGd foram de 85% e 90%, respectivamente, para a análise dos espectros de RMN e infravermelho.

O grau de desacetilação do PNAG está intimamente relacionado a propriedades imunogênicas dos exopolissacarídeo (GIERSING *et al.*; 2016). Isso ocorre porque a taxa de fagocitose do PNAG é dependente do seu grau de desacetilação (MAIRA-LITRAN *et al.*, 2005) e, da interação do PNAG com os receptores *toll like* (TLR), que é dependentes de cargas, de modo que, quanto maior o grau de desacetilação, maior será o número de potenciais sítios formadores de cargas (KALKA-MOLL *et al.*, 2002).

Assim, para demonstrar este efeito, células mononucleares de sangue periférico de bovino foram expostas à diferentes concentrações de PNAG nativo e PNAGd e avaliou-se os efeito por citometria de fluxo.

A figura 6 apresenta a citotoxicidade de linfócitos e monócitos expostos ao PNAG nativo e PNAGd nas concentrações de 0,0375; 0,375; 3,75 e 7,5 µg/mL. Não foram identificados efeito citotóxico para ambos os polímeros e tipos celulares, exceto para o PNAGd na concentração de 7,5 µg/mL para linfócitos (P=0,015). Apesar do PNAGd ter exercido efeito citotóxico na concentração de 7,5 µg/mL, a mortalidade celular apresentou percentagem crescente de células mortas, se ajustando a uma curva de tendência polinomial ($R^2=0,9983$). O PNAGd possui entre 85 e 90% de desacetilação, o que lhe confere alta densidade de cargas

positivas. Materiais catiônicos podem induzir efeito citotóxico ao promoverem a desestabilização da membrana celular, efeito este que é mais pronunciado em células sem capacidade fagocítica (FRÖHLICH, 2012).

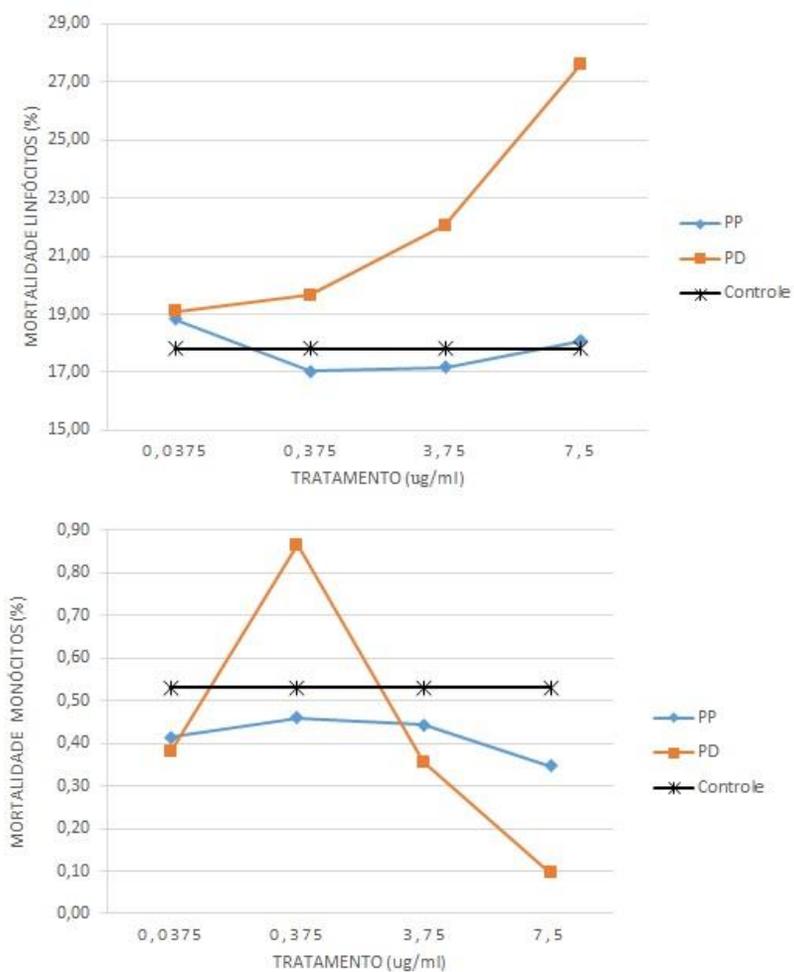


Figura 6: Médias de mortalidade dos linfócitos e monócitos em relação aos tratamentos (PP corresponde ao PNAG bruto e PD corresponde ao PNAG desacetilado).

Ao avaliar os gráficos de densidade de linfócitos e monócitos da figura 7, as populações de linfócitos apresentam comportamento de dispersão constante dentro das janelas de marcação. Por sua vez, nas populações de monócitos pode-se verificar um deslocamento angular no sentido anti-horário nas janelas de marcação da população em relação ao grupo controle. Destaca-se que este foi um padrão de comportamento discretamente mais intenso nas concentrações maiores de ambos os polímeros. Os parâmetros SSC e FSC respondem respectivamente por complexidade e tamanho celular (BJERKNES *et al.*, 1989). Ambos, tanto a difração da luz por polímeros quanto a formação de fagossomos podem aumentar a difração do feixe de laser do citômetro, resultando em modificação no parâmetro SSC (BJERKNES *et al.*, 1989; RODRIGUEZ *et al.*, 2013). Por sua vez, a formação de fagossomos, ao longo do tempo, pode modificar o volume celular interferindo no parâmetro FSC (RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

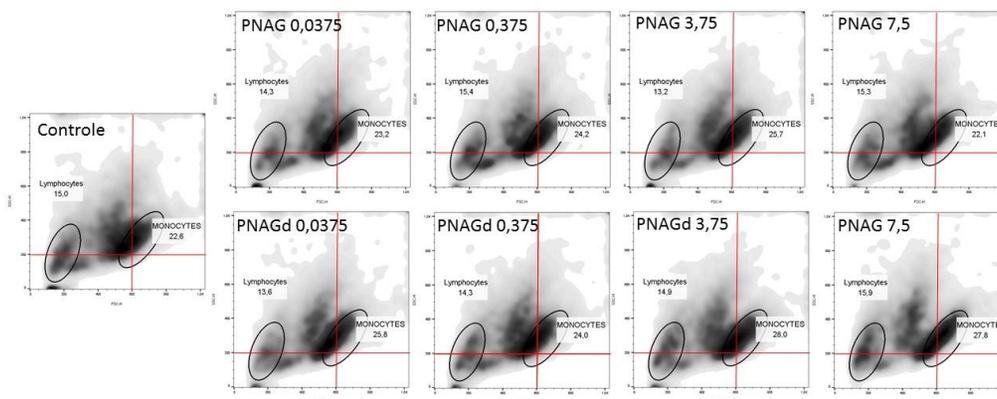


Figura 7: Gráficos de densidade de citometria de fluxo de células mononucleares de sangue periférico bovino (PBMC). PNAG corresponde ao PNAG bruto e PNAGd ao desacetilado.

Ambos os polímeros apresentaram indicativos semelhantes de fagocitose quando se considera os parâmetros SSC e FSC, o que diferiu do relatado por

Maira-Litran e colaboradores (2005). A diferença pode ser atribuída ao grau de deacetilação que interfere diretamente na taxa de fagocitose do PNAG nativo (KALKA-MOLL et al., 2002; MAIRA-LITRAN et al., 2005), que comparados com a literatura utilizando a mesma técnica de determinação do grau de desacetilação, identificou-se 66% para PNAG nativo frente aos 15% relatados (MAIRA-LITRAN et al., 2005). Diferenças entre as estirpes bacterianas utilizadas por ambos os experimentos podem ser explicadas pela grande variabilidade gênica associados à biossíntese do PNAG, que é controlada pelo operon *ica*, composto pelos genes *icaADBC*, pela ação do gene repressor *icaR* (MAIRA-LÍTRAN et al., 2002; ARCIOLA et al., 2015) e pela ação de genes acessórios como por exemplo os genes *bap*, *agr*, *sarA* e outros (ARCIOLA et al., 2015; KIM et al., 2008). Ou pela expressão desses genes é governada por fatores ambientais multivariados, como por exemplo tensão de oxigênio, presença de glicose, quantidade de ferro iônico entre outros (ARCIOLA et al., 2015), o que faz com o fenótipo nem sempre seja exatamente igual ao genótipo (SALIMENA et al., 2016). Finalmente, considerando que o grau de desacetilação do PNAG nativo é influenciado por variações genéticas e ambientais a diferença de comportamento entre os trabalhos pode ser atribuída à estirpe bacteriana que deu origem aos PNAG nativos de ambos os experimentos.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra o *fingerprint* espectral Raman e Infravermelho do PNAG de *S. aureus*, seguido de descrição detalhada de suas respectivas bandas espectrais típicas. Por ambas técnicas foi possível calcular o grau de desacetilação do PNGA de forma rápida e não destrutiva, o que permite o reaproveitamento da amostra para outras abordagens experimentais ou biotecnológicas. Contudo, a técnica de Raman apresentou limitações quando utilizada para determinar o grau de desatilação do PNAGd, necessitando ser otimizada para este caso. Finalmente, considerando a importância do biofilme nos processos infecciosos e as perspectivas de uso biotecnológico do PNAG extraídos de *S. aureus*, as técnicas aqui descritas apresentam potencial aplicação em controle de processos e em estudos de epidemiologia bacteriana, de patogênese, de imunologia e de resistência antimicrobiana associados às enfermidades causadas por *S. aureus*.

**APPLICATIONS OF SPECTROSCOPIC TECHNIQUES FOR THE
CHARACTERIZATION OF POLI-N-ACETYLGLUCOSAMINE
EXTRACTED FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

ABSTRACT

Mastitis is one of the principal diseases that affects dairy herds around world. According WHO, *Staphylococcus aureus*, the main etiological agent of this disease, was recently included in global priority list of antibiotic-resistant bacteria. This pathogen causes extreme threats to health and therefore, requires extensive research and efforts for development of new and effective drugs and vaccines. The biofilm, an important factor of virulence produced by this bacteria, has as the main component the exopolysaccharide (PNAG). Thus, the present research proposes the vibrational spectroscopy evaluation of *S. aureus* PNAG and its application as non - destructive alternative to determine the degree of polymer deacetylation, and the possible polymer cellular toxicity. The PNAG characterization was performed by nuclear magnetic resonance, Raman, infrared and dynamic light scattering. Biological tests were accomplished using bovine peripheral blood mononuclear cells to evaluate the compound acute toxicity. The polysaccharide was toxic to lymphocytes only at highest concentration (7.5 mg / mL), suggesting that the higher degree of deacetylation, higher the rate of fagocytosis. This study has potential application for the development of immunostimulators for bovine mastitis treatment.

Keywords: MASTITIS, *Staphylococcus aureus*, Raman,

REFERÊNCIAS

- ABDOLI, L.; SUO, X.; LI, H. Distinctive colonization of *Bacillus* sp. bacteria and the influence of the bacterial biofilm on electrochemical behaviors of aluminum coatings. **Colloids Surf B Biointerfaces**. 145, 688-694. 2016,
- ALMEIDA, M.R.; ALVES, R.S.; NASCIMBEM, L.B.L.R.; STEPHANI, R.; POPPI, R.J.; DE OLIVEIRA, L.F.C. Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. **Anal Bioanal Chem**, 397, 2693-2701. 2010
- ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., RAVAIOLLI, S., MONTANARO, L. Polysaccharide intercellular adhesion in biofilm: structural and regulatory aspects. **Cell and Inffec Mic**. V5, p.1-10, 2015.
- ASHTON, L.; LAU, K.; WINDER, C.L.; Goodacre, R. Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification. **Future Microbiol.** , 6, 991-997. 2011
- BALÁZS, N.; SIPOS, P. Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 342(1), p. 124-130, 2007.
- BALES, P.M.; RENKE, E.M.; MAY, S.L.; SHEN, Y.; NELSON, D.C. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. **Plos One**, 8, e67950. 2013
- BJERKNES, R., BASSOE, C-F.; SJURSEN, H.; LAERUM, O. D.; SOLBERG, C. Flow cytometry for the study of phagocyte, **Reviews of infectious diseases**. v.1 (1), 1989
- BONNIN, S.; BESSON, F.; GELHAUSEN, M.; CHIERICI, S.; ROUX, B. A FTIR spectroscopy evidence of the interactions between wheat germ agglutinin and N-acetylglucosamine residues. **FEBS Lett.**, 456, 361-364. 1999

DYBAS, J.; MARZEC, K.M.; PACIA, M.Z.; KOCHAN, K.; CZAMARA, K.; CHRABASZCZ, K.; STANISZEWSKA-SLEZAK, E.; MALEK, K.; BARANSKA, M.; KACZOR, A. Raman spectroscopy as a sensitive probe of soft tissue composition – Imaging of cross-sections of various organs vs. single spectra of tissue homogenates. **Trends in Anal Chemistry**, 85, Part C, 117-127. 2016

GIERLINGER, N.; SCHWANNINGER, M. Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy. **Pl. physiology**, 140, 1246-1254. 2006

GÓRSKA, S.; SANDSTRÖM, C.; WOJAS-TUREK, J.; ROSSOWSKA, J.; PAJTASZ-PIASECKA, E.; BRZOZOWSKA, E.; GAMIAN, A. Structural and immunomodulatory differences among lactobacilli exopolysaccharides isolated from intestines of mice with experimentally induced inflammatory bowel disease. **Sci Rep.**, 6, 37613. 2016

GUINESI L. S.; CAVALHEIRO E. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochimica Acta**. v. 444, p. 128-133, 2006.

IVLEVA, N.P.; WAGNER, M.; HORN, H.; NIESSNER, R.; HAISCH, C. Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix. **Raman microscopy Anal Bioanal Chem.**, 393, 197-206. 2009

JOYCE, J. G.; ABEYGUNAWARDANA, C.; XU, Q.; COOK, J. C.; HEPLER, R.; PRZYSIECKI, C. T.; GRIMM, K. M.; ROPER, K.; YU IP, C. C.; COPE, L.; MONTGOMERY, D.; CHANG, M.; CAMPIE, S.; BROWN, M.; MCNEELY, T. B.; ZORMAN, J.;

MAIRA-LITRÁN, T.; PIER, G. B.; KELLER, P. M.; JANSEN, K. U. ; MARK III, G. E. Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate research** 338 p. 903 – 922 (2003)

MAIRA-LITRÁN, T.; KROPEC, A. GOLDMANN, D. A.; PIER, G.B. Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated staphylococcal poly-

n-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. **Infection and immunity**. v.73 (10), p.6752-6762, 2005

KALKA-MOLL, W.M.; TZIANABOS, A.O.; BRYANT, P.W.; NIEMEYER, M.; PLOEGH, H.L.; KASPER, D.L. Zwitterionic Polysaccharides Stimulate T Cells by MHC Class II-Dependent interactions. **J Immunol.**, 169, 6149-6153. 2002

KUO, M.-S.; MORT, A.J.; DELL, A. Identification and location of 1-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum. **Carbohydrate Research**, 156, 173-187. 1986

LAUCKS, M.L.; SENGUPTA, A.; JUNGE, K.; DAVIS, E.J.; SWANSON, B.D. Comparison of Psychro-Active Arctic Marine Bacteria and Common Mesophilic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Appl Spectrosc.**, 59, 1222-1228. 2005

LITVINOV, RUSTEM I.; FAIZULLIN, DZHIGANGIR A.; ZUEV, YURIY F.; WEISEL, JOHN W. The α -Helix to β -Sheet Transition in Stretched and Compressed Hydrated Fibrin Clots. **Biophys J.**, 103, 1020-1027. 2012

MANSUR, A.A.P.; DE ALMEIDA, C.G.; DE CARVALHO, S.M.; DE FARIA, L.V.; DE ALMEIDA, M.V.; MANSUR, H.S. Cytocompatible Fluorescent Quantum Dot/PEG-Chitosan Bioconjugates for Nanomedicine Applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, , 4555-4564. 2015

MAQUELIN, K.; KIRSCHNER, C.; CHOO-SMITH, L.P.; VAN DEN BRAAK, N.; ENDTZ, H.P.; NAUMANN, D.; PUPPELS, G.J. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. **J Microbiol Methods.**, 51, 255-271. 2002

MARZOCCA, M.P.; HARDING, N.E.; PETRONI, E.A.; CLEARY, J.M.; IELPI, L. Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. **J Bacteriol.**, 173, 7519-7524. 1991

OTTO M. Staphylococcal biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol** v.322, p.207–228. 2008

PELTON, J.T.; MCLEAN, L.R. Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. **Anal Biochemistry**, 277, 167-176. 2000

PELTRE, C.; GREGORICH, E.G.; BRUUN, S.; JENSEN, L.S.; MAGID, J. Repeated application of organic waste affects soil organic matter composition: Evidence from thermal analysis, FTIR-PAS, amino sugars and lignin biomarkers. **Soil Biology and Biochemistry**, 104, 117-127. 2017

RAMYA, S.; GEORGE, R.P.; RAO, R.V.S.; DAYAL, R.K. Detection of algae and bacterial biofilms formed on titanium surfaces using micro-Raman analysis. **Applied Surface Science**, 256, 5108-5115. 2010

REUBER, T.L.; WALKER, G.C. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. **Cell.** , 74, 269-280. 1993

SALDARRIAGA L., Standartization of bovine macrophage manolayers and isolation and culture of Thrypanosomes, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98 (2), p.269-271, 2003

SALIMENA, A. P. S., LANGE, C. C., CAMUSSONE, C., SIGNORINI, M., CALVINHO, L. F., BRITO, M. A. P., BORGES, C. A. V., GUIMARÃES, A. S., RIBEIRO, J. B., MENDONÇA, L. C., PICCOLI, R. H. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. **Vet Res Commun**, 2016.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M.; BARANSKI, R. Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. **Biopolymers**, 77, 212-221. 2005.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y.; R. FISCHER, E.; R. DELEO, F.; OTTO, M. A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. **J Biol Chem.**, 279, 54881–54886. 2004

VUONG, C.; VOYNICH, J.M.; FISCHER, E.R.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R.; DELEO, F.R.; OTTO, M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. **Cell Microbiol.** , 6, 269-275. 2004

WILLYARD, C. Drug-resistant bacteria ranked. **Nature**. V. 543. P.15, 2017

ZAJĄC, A.; HANUZA, J.; WANDAS, M.; DYMIŃSKA, L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**, 134, 114-120. 2015

ZVEZDOVA, D. Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea. **Sci Univ of Rouse**, 49, 65-69. 2010

ARTIGO 2

**TITANIUM DIOXIDE AND ZINC OXIDE NANOPARTICLES DID NOT
PRESENT ORAL ACUTE TOXICITY IN FEMALE MICE**

Cynthia Penoni Volpi Abreu¹

Patrícia Vilhena Andrade Dias²

Flademir Wouters³

Michele Munk Pereira⁴

Catiuscia Padilha de Oliveira⁵

Raimundo Vicente de Sousa³

Humberto de Mello Brandão⁶

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Scientific Reports

¹ (Médica Veterinária, Mestrado em Ciências veterinárias- UFLA)

² (Médica veterinária – Pós doutoranda Embrapa Gado de Leite)

³ (Médico Veterinário – Doutor, professor Universidade Federal de Lavras)

⁴ (Bióloga – Doutora, professora Universidade Federal de Juiz de Fora)

⁵ (Farmacêutica – Doutora)

⁶ (Médico Veterinário – Pesquisador Embrapa gado de Leite)

INTRODUCTION

The nanomaterials (NMs) have had a great development and the nanotechnological industry is in continuous growth. Some nanomaterials, like titanium dioxide (TiO₂) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles (NPs) are currently used in cosmetic, pharmaceutical, personal care products (like toothpaste) and even in the food industry. The wide range of applications of these NPs is due to their special properties, including a bright white color, ultraviolet light absorption, and antimicrobial activity (1). Both ZnO and TiO₂ are materials with generally low toxicity when bulk-sized (2, 3). Zinc is an essential trace element and it is present in foods or added as a nutritional supplement (1). TiO₂ is used in the food industry (E171 in Europe) as a white pigment (3). However, NMs possess very different physicochemical properties and can have negative health effects (3, 4). Besides, in the commercial production of bulk-sized ZnO and TiO₂, NPs can also be produced, generating products with particles of different sizes (3). In the additive E171, for example, up to 36% of the particles can be NP-sized (5).

Composition, size, aspect ratio, shape and surface area of NM are determinant for their interactions with biological systems and thus important from a toxicological perspective (4). TiO₂ NPs and ZnO NPs are considered toxic when inhaled. This effect is influenced on the size, car there is a tendency for higher toxicity with the smallest

particles (4). Transfer and systemic distribution of NP has been reported after oral exposure, however, the absorption of TiO₂ after ingestion is still unclear (3). Recently, Bettini et al. (5) reported transepithelial passage of food-grade TiO₂ in the jejunum and the colon after one week of oral ingestion (10 mg/kg/day) and this affected intestinal immune response. Chronic ingestion of TiO₂ NPs may create an inflammatory environment and favor the development of preneoplastic lesions in the colon (5). The oral toxic potential of ZnO NP is best described in the literature (1). Signs of acute toxicity, lesions in the liver, renal, and heart tissue and even death were already observed in mice after ingestion of one oral dose of 5 g/kg ZnO NPs (6).

To foresee the health aspects of a NM, it is necessary to correlate the chemical composition and physical-properties to their biological effects. Furthermore, due to the high variability of the properties of the NM and their impact on the risk assessment, it is important to evaluate the toxicity of reference materials that can be used as positive and negative controls. By these concerns, reference ZnO and TiO₂ NPs provided by the European Union Joint Research Centre (EU JRC) were analyzed to determine their primary phase structure, particle size distribution, morphology and specific surface area, pore volume and average diameter. An in vitro study was conducted to detect the physicochemical changes of ZnO and TiO₂ NPs in simulated biological media, close to the digestive tract of mice. Considering that the

toxicological effects of the inorganic NP are not totally established, these well-characterized NM were then used in an in vivo study to evaluate the potential acute oral toxicity of TiO₂ NPs and ZnO NPs tested at four different doses, following the OECD Guideline 423 for Testing of Chemicals.

RESULTS

In this study, two NMs were used: TiO₂ nanoparticles (TiO₂ NPs) and ZnO nanoparticles (ZnO NPs). The NMs powders were supplied by European Commission, TiO₂ JRCNM01001a990470 and ZnO JRCNM01101a990916.

Characterization of TiO₂ and ZnO nanoparticles

X-ray diffraction (XRD)

Primary phases of the NMs cores were identified by X-ray diffraction. PXRD patterns are displayed in Figure (1). TiO₂ pattern corresponds to anatase phase of the material, JCPDS card no. 21-1276 and pattern of ZnO corresponds to the wurtzite phase, JCPDS card No. 36-1451. Crystallite sizes (D_{hkl}) of NMs were estimated using the Scherrer's equation. The most intense peaks were used in the calculation. Peak width-full width at half maximum (FWHM) or w was

determined by Lorentz fitting. D_{hkl} values are summarized in Table 1.

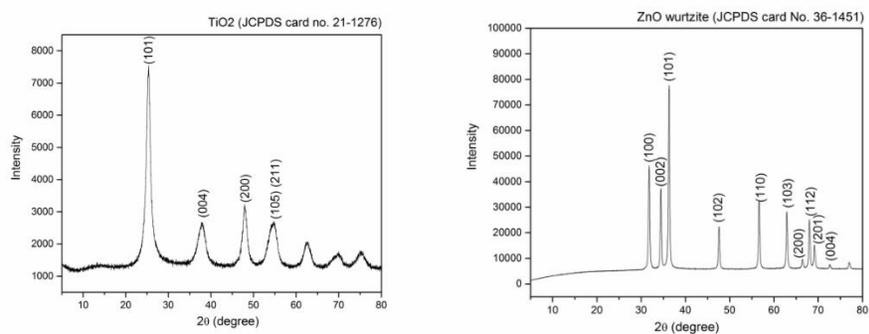


Figure 1. X-ray diffraction (PXRD) patterns of (a) TiO₂ and (b) ZnO.

Table 1. Crystallite size and associated error SD of NMs.

Sample	Crystallite size (nm)	Associated error SD (nm)
TiO ₂	7.718	0.036
ZnO	17.662	0.328

Field emission gun-scanning electron microscopy (FEG-SEM)

ZnO NPs presented two distinguished phases when concerning the dimension, a nanometric phase, composed of particles of dimensions < 200 nm and of a micrometric phase, with particle of

dimensions > 200 nm. The two divided phases could be identified and characterized by MEV-FEG imaging, after the material dispersion using BSA solution as a solvent. For determining the particle dimensions of ZnO and TiO₂, the FEG-SEM images were managed with the software of public domain *Image J. Morphology* descriptions and mentions are summarized in Table 2. The dimension reported is related to the greater diameter, identified as the length. Histograms of size distribution for the two phases of ZnO (nano and micro) are given in Figure 2.

Table 2. Dimensions of NMs measured using Image J.

Sample	Characterization	shape - morphology	dimensions (nm)
ZnO	very agglomerated material of heterogeneous morphologies and dimensions, among them rods, spheres and prisms.		Diameter
		rods	37 ± 8
		Spheres	540 ± 290 nm
		prisms	
TiO ₂	very agglomerated nanoparticles, morphology of spheres	Spheres of diameters < 20 nm	

	few isolated faceted prisms	> 200 nm
--	-----------------------------	----------

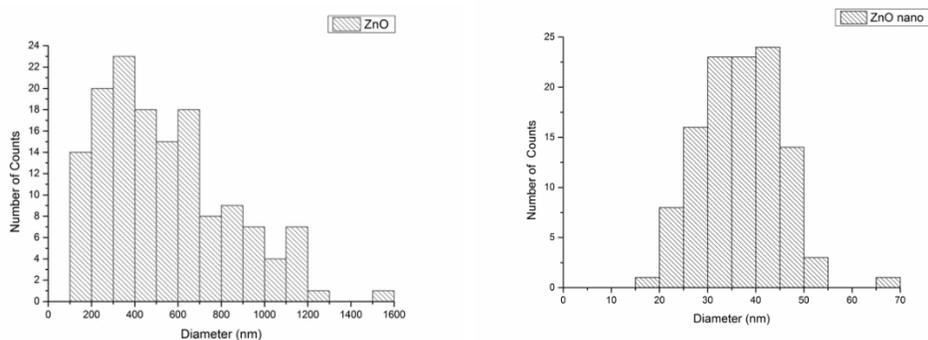


Figure 2. Histograms of ZnO (a) phase micro and(b) phase nano obtained from FEG-SEM images.

The TiO_2 sample could not be well dispersed and a micrometric phase composed by bodies containing much agglomerated nanoparticles of diameters measuring less than 20 nm could be detected. Isolated individual particles could not be measured, due to microscope limitations; thus, measurements of size and distribution were not possible. The material showed also a few isolated particles of distinguished format and dimensions, with micrometric dimension, t.i., diameters higher than 200 nm. Figures 3 and 4 bring images of ZnO and TiO_2 nanomaterials.

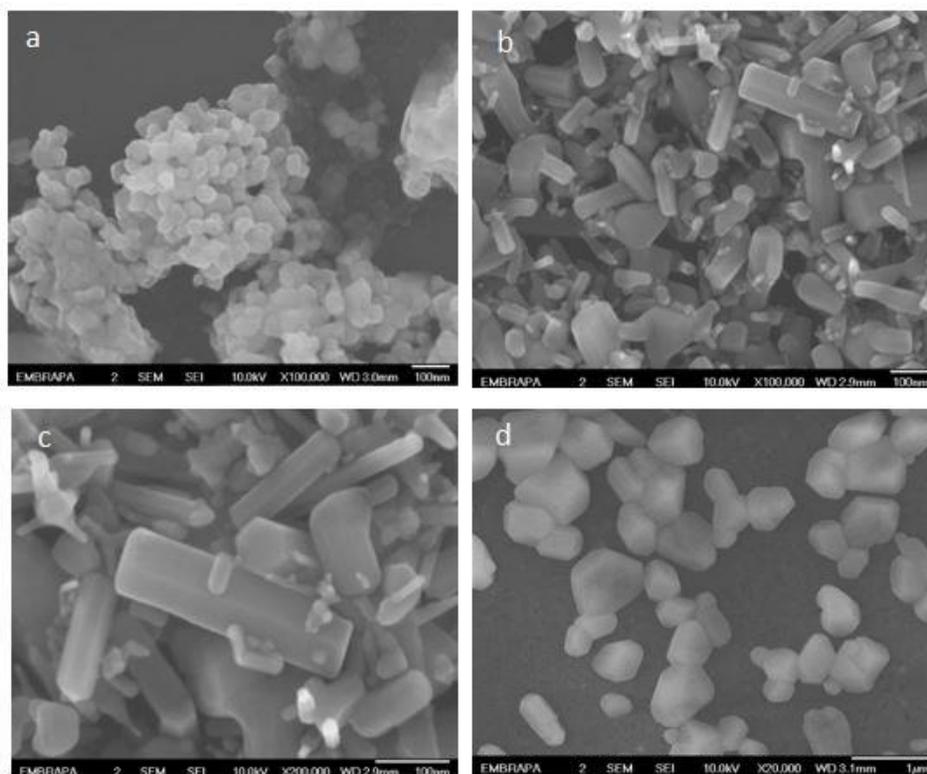


Figure 3. FEG images of ZnO showing the different particle morphologies. (a) Agglomerated particles showing not well defined morphology; (b) and (c) Agglomerated particles of diverse morphologies, containing long and short rods, prisms and faceted rods with large size distribution; (d) Particles dispersed in BSA solvent, where only major particles are seen: regular and irregular prisms.

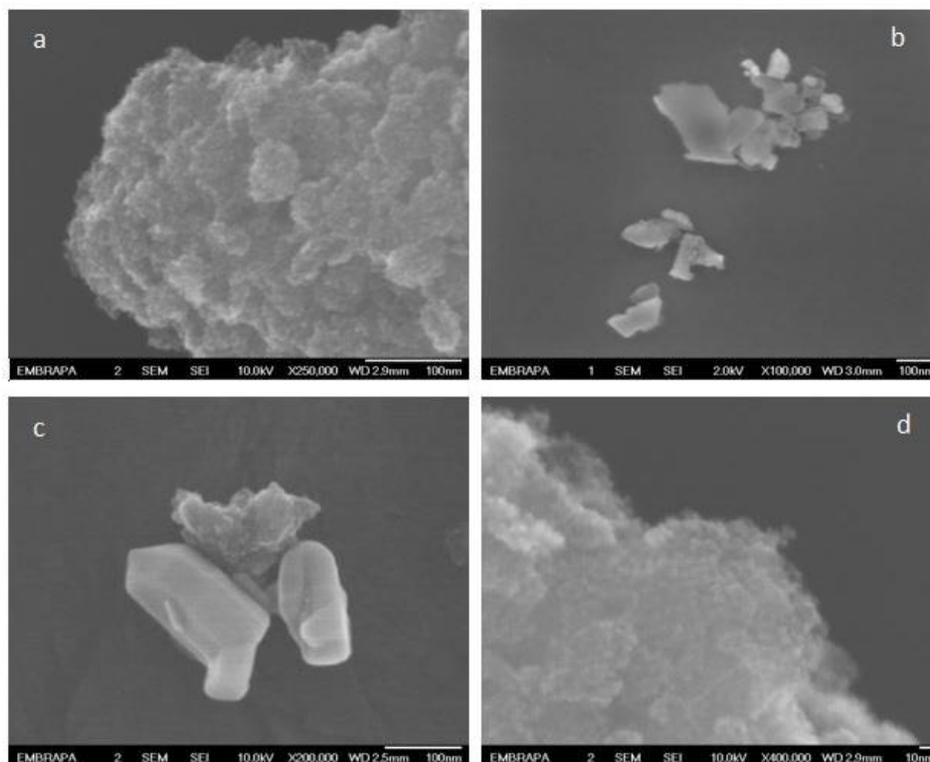


Figure 4. FEG images of TiO₂. (a) and (d) Very agglomerated particles of nanometric dimension (< 10 nm); (b) Particles of irregular morphology and size distribution; (c) Biphasic material containing agglomerated nanometric particles and micrometric faceted particles.

Specific surface area (SSA) by the BET

The results of specific surface area, pore volume and the average diameter are shown in Table 3. According to the classification

applied to pore diameter: micropores are those filled with adsorbate during the adsorption process and measure less than 20 Å; mesopores are areas in which occurs the monomolecular and polimolecular adsorption. Capillary condensation is possible where these micropores measuring 20-500 Å and so-called macropores include pores of over 500 Å. Both ZnO and TiO₂ nanoparticles analyzed were considered as mesoporous materials.

Table 3. Specific surface area, pore volume and size for ZnO and TiO₂.

<i>Sample</i>		<i>TiO₂</i>	<i>ZnO</i>
<i>Surface Area</i>	<i>BET(m²/g)</i>	3.126.766	132.087
	<i>Langmuir (m²/g)</i>	4.344.041	203.403
<i>Pore Volume</i>	<i>Adsorption (cm³/g)</i>	0.335872	0.054810
	<i>Desorption (cm³/g)</i>	0.458828	0.150002
	<i>BJH Adsorption (cm³/g)</i>	0.292952	0.066485
	<i>BJH Desorption (cm³/g)</i>	0.421630	0.201761
<i>Pore Size</i>	<i>Adsorption by BET (nm)</i>	429.674	1.659.815
	<i>Desorption by BET (nm)</i>	586.968	4.542.525

	<i>BJH Adsorption (nm)</i>	<i>81.109</i>	<i>237.678</i>
	<i>BJH Desorption (nm)</i>	<i>106.316</i>	<i>620.150</i>

In vitro experiment

DLS tests were performed measuring the ZnO and TiO₂ particles size and Zeta Potential suspended in simulated digestion fluids: simulated salivary fluid without enzyme (SSF), simulated gastric fluid without enzyme (SGF) and simulated intestinal fluid without enzyme (SIF). Values found for particles size (Tables 4 and 5) and zeta potential (Tables 6 and 7) differ for each simulated digestive fluid suspensions, what demonstrates that the dispersions of nanoparticles, their configuration, stability and distribution change along with the period of digestion and change in fluids of host organs (mouth, stomach or duodenum). Especially the values of zeta potential differ, thus particles are differently charged, depending on the free charges distribution and concentrations of the fluids they were dispersed.

Table 4. Size measurements of TiO₂ nanoparticles sequentially suspended in simulated digestive fluids.

	Initial				2 min				2 h				4 h and 2 min			
	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV
Ultrapure water + BSA	569.7	8.8	0.36	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSF + BSA	-	-	-	-	559.6	15.7	0.52	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
SGF+ BSA	503.5	15.1	0.49	0.01	-	-	-	-	510.2	8.5	0.51	0.01	-	-	-	-
SIF+ BSA	498.5	9.0	0.52	0.01	-	-	-	-	403.7	2.4	0.49	0.01	-	-	-	-
SSF/S GF/SIF + BSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	259.4	14.2	0.32	0.01

Table 5. Size measurements of ZnO nanoparticles sequentially suspended in simulated digestive fluids.

	Initial				2 min				2 h				4 h and 2 min			
	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV	Size (d.nm)	SDV	PDI	SDV
Ultrapure water + BSA	146.1	2.5	0.60	0.13	-	-	-	-	146.1	2.5	0.60	0.13	-	-	-	-

SSF + BSA	-	-	-	-	189.2	16.9	0.79	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-
SGF+ BSA	58.9	10.0	0.84	0.10	-	-	-	-	224	27.2	0.43	0.04	-	-	-	-
SIF+ BSA	215.2	4.3	0.44	0.01	-	-	-	-	213.1	6.8	0.48	0.05	-	-	-	-
SSF/SGF/SIF + BSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	125.5	14.7	0.60	0.15

Table 6. Measurements of zeta potential for TiO₂ NPs sequentially suspended in simulated digestive fluids.

	Initial		2 min		2 h		4 h and 2 min	
	ZP (mV)	SDV	ZP (mV)	SDV	ZP (mV)	SDV	ZP (mV)	SDV
Ultrapure water + BSA	-29.16	0.17	-	-	-29.16	0.17	-	-
SSF + BSA	-	-	-13.63	0.51	-	-	-	-
SGF+ BSA	+19.73	0.11	-	-	+17.90	0.80	-	-
SIF+ BSA	-24.7	1.2	-	-	-31.23	3.11	-	-
SSF/SGF/SIF + BSA	-	-	-	-	-	-	+14.63	0.68

Table 7. Measurements of the zeta potential of ZnO nanoparticles sequentially suspended in simulated digestive fluids

	Initial		2 min		2hs		4h and 2min	
	ZP (mV)	SDV	ZP (mV)	SDV	ZP (mV)	SDV	ZP (mV)	SDV
Ultrapure water + BSA	-15.76	0.97	-	-	-15.76	0.97	-	-
SSF + BSA	-	-	-16.43	0.84	-	-	-	-
SGF+ BSA	+17.3	1.06	-	-	+16.83	0.58	-	-
SIF+ BSA	-24.47	1.71	-	-	-33.07	1.38	-	-
SSF/SGF/SIF + BSA	-	-	-	-	-	-	+17.06	0.51

In vivo experiment

Animals receiving TiO₂

In all groups, including the control group, the body weights increased ($p < 0.05$) seven days after receiving TiO₂ NPs by gavage. No adverse clinical sign was observed during the observation period (14 days). All the animal were euthanized at the end of the experiment and there were no visible lesions in the macroscopic examination neither in the histopathological analyses.

Animals receiving ZnO

In this trial, we did not observe mortality or clinical signs indicating a toxic effect of ZnO NPs, even in the highest dose (2000 mg/kg). As for the TiO₂ experiment, the only significant ($p < 0.05$) effect was an increase in the body weights after seven days; however, this happened in all groups, including the control. Macroscopic examination and histopathological analysis did not show any visible lesions in the different organs.

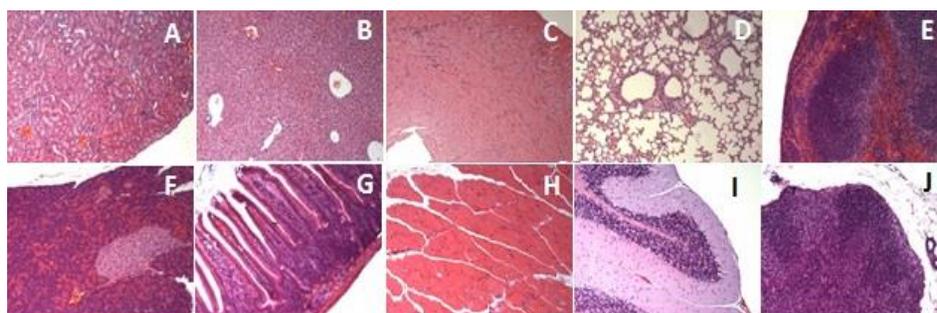


Figure 5. Histopathology of A - Kidney; B - liver; C - heart; D - lung; E - spleen; F - pancreas; G - intestine; H - muscle; I - brain; J - lymph nodes. All organs without toxicity signs.

DISCUSSION

Growing concerns over the safe introduction of NMs in the current life emphasize the necessity to characterize them, thus scientist still do not know precisely how these materials interact with the environment and which risks are involved (7). In this study, we tested two widespread NPs, TiO₂ and ZnO. Oral toxicity was

chosen, because consumption of these NPs may occur by direct ingestion of food containing additives or supplements or accidentally in personal care products or cosmetics.

Three phases are important in a strategy for assessing the risk of NP, physicochemical characterization, in vitro and in vivo assays (4). We worked with reference materials (TiO₂ JRCNM01001 and ZnO JRCNM01101) and our first step was to characterize the NMs. Both ZnO and TiO₂ can present different forms, however primary phases of the NM cores identified by X-ray diffraction were in accordance with the JCPDS cards for anatase TiO₂ and wurtzite ZnO as expected and showed intense well defined peaks, indicating no contaminations of these materials. The NPs analysed were considered as mesoporous materials. TiO₂ nanoparticles showed particles of distinguished format and dimensions, indicating that these NMs contained distinct morphological phases, one micrometric made up of faceted particles, where prisms and rods and faceted tubes are noticed; and one very agglomerated phase made up of nanometric particles. Isolated individual particles could not be detected, probably due to microscope limitations. In addition, measurements of size and distribution were not possible, thus higher magnification are required.

ZnO nanoparticles were composed of only one primary phase, but displayed two phases when concerning the dimension, a nanometric phase (< 200 nm) and a micrometric phase (> 200 nm). This material

could be dispersed into individually identified particles when the dispersion was performed using BSA solution as a solvent, thus the interaction with biomolecules can increase the amount of ZnO dispersed in solution. Among all the materials, ZnO exhibits the poorest dispersion in aqueous solvent at neutral pH. The identification of the two phases depends on the adequate operation of the FEG-SEM equipment. When operated at 10.00 kV of accelerating voltage, only micrometric particles were visible, while dispersed nanometric (< 100 nm) particles were hidden. These particles could be seen when they were strongly agglomerated, promoting micrometric visible “agglomerates” of ZnO particles, which were rather not measurable. When accelerating voltage is changed to 2.00 kV, nanometric phase is visible. Individual particles were measured as spheres and the morphology of the micrometric phase was not spherical, but rather elliptical or oval.

NMs characteristics can vary during their passage through the gastrointestinal tract. The pH variations have a strong effect on surface charge of the particles and, consequently, on agglomeration and cellular uptake (8). In the in vitro study simulating the time of retention in each compartment and the pH alterations during the digestion, we observed that the particles size and zeta potential are different for each simulated digestive fluid suspensions, what demonstrates that the dispersions of nanoparticles, their configuration, stability and distribution change along with the time of digestion and change in fluids of host organs (mouth, stomach or

duodenum). Both TiO₂ and ZnO NPs were negative charged in the initial suspension, but were positive charged in the simulated intestinal fluid. These results suggest that the nanoparticles, when ingested, should interact differently with the host organs along with the digestive tract and this could interfere in the absorption possibilities of the nanoparticles. In fact, positively charged particles show better absorption than neutral or negatively charged particles (1). Accordingly to Baek et al. (2), ZnO NPs are mostly dissolved in the stomach to form Zn²⁺ ions, and are then taken up in the tissues by interaction between zinc and sulfur-containing ligands in proteins. This may partially explain the higher absorption of ZnO than TiO₂ (1).

The results of the *in vivo* study demonstrated an absence of toxicological effects after an oral administration of ZnO or TiO₂. In neither of the four doses tested (5, 30, 300 and 2000 mg/g) significant clinic effects or damaged in organs was observed. The results obtained are in concordance with others evaluations of the toxicity of TiO₂ NPs and ZnO NPs. In the study conducted by Warheit et al (9), it were evaluated the subchronic 90-day toxicity, the 28-day repeated-dose oral toxicity and the acute oral toxicity of TiO₂ and they did not observe any toxicological effect. Similar results are described by ZnO nanoparticles until the doses of the 2000 mg/kg (10). After oral exposure, transfer and systemic distribution of NP has been reported via the gut in several studies,

however the absorption rate is usually very low for TiO₂ (1, 11), low ZnO (1, 2) and may be dose-dependent (3). This may explain the absence of toxicity after a single dose. Also, some NPs can aggregate in the digestive fluids, especially when the dose is high, resulting in more difficulty to penetrate the cells and consequently in lower oral absorption at a high dose than at lower doses (3). It is not clear if this occurs with TiO₂ and ZnO. With ZnO the amount absorbed increased as the dose administered increased up to 2000mg/kg, and zinc level in all the organs decreased to normal levels, 7 days after administration (2). When a very high dose was used (5g/kg), ZnO NPs aggregated in the gastrointestinal tract, causing intestinal obstruction and death of two mice (6). Pasupuleti et al. (12) observed a higher incidence of microscopic lesions in liver, pancreas, heart and stomach in rats treated with a low-dose (5 mg/kg) when compared to the high-dose group (2000 mg/kg), suggesting the importance of considering the particle number concentration rather than conventional mass concentration in calculating the doses effects. It is possible that the impact of NPs' physical properties on their kinetics is different accordingly to the route of absorption (oral, dermal or respiratory).

Considering this and the accumulation of these NPs in various organs and blood plasma after repeated doses (11) it is possible that ZnO and TiO₂ may not show acute toxicity and they may induce chronic toxic effects. Comparing a single dose of ZnO with repeated

dose 90-day oral toxicity, showed an accumulation of Zn in blood after the chronic exposure. After a 100 day treatment with TiO₂, Bettini et al (5) observed colon microinflammation and initiated preneoplastic lesions in rats receiving 10 mg/kg/d.

Besides the dose and the duration of the exposure, experimental data has shown that the size and the form of these NP strongly affects their pharmacokinetic behavior and the toxic effect. For example, the rutile TiO₂ may reach up to a factor of four higher levels in the spleen than the anatase (3) the form of the TiO₂ in our experiment. Comparing Zn powders of different sizes, Wang et al. (6) observed more severe symptoms (lethargy, nausea, vomiting, and diarrhea) in mice that received an oral dose Zn nano scaled than the micro scaled, but only slight differences in blood biochemistry.

CONCLUSIONS

The biological activity of NPs is strongly influenced by their composition and physicochemical characteristics. Thus, it is important to test well-characterised NMs to understand their specific effect in the biological system. It would be interesting to establish a reference material with known effects to be used as positive/negative control in the in vitro and in vivo tests, facilitating the comparisons between experiments. The use of standard

protocols and test are also important in comparing the toxicity of different NPs.

In this experiment, we did not observe any toxic effect of ZnO and TiO₂ NPs of reference grade after one dose of 5, 30, 300 or 2000 mg/g. However, human consumption of NPs is usually chronic, reinforcing the need to conduct long-lasting experiments to assess the risk of NPs.

METHODS

Characterization of TiO₂ and ZnO nanoparticles

Powder X-ray diffraction (PXRD):

Primary phase in the NMs were determined by Powder XRD. PXRD patterns were recorded at 25°C using a Shimadzu XRD-6000 diffractometer. The instrument operated with Cu anode (Tube 1.0 x 10 mm) (Cu $\kappa\alpha$, $\lambda = 0.154$ nm), which was excited with a voltage of 30 kV and filament current of 30 mA. ZnO and TiO₂ samples in powder form were supported on a glass sample holder and scanned at 2θ range of 5 – 85° under fixed time mode of 4 s and sampling pitch of 0.02°. PXRD patterns were used to identify the primary crystalline phase, occurring in the NMs as per the Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). PXRD data were further

used to determine the crystallite size (D_{hkl}) of each NM using the Scherrer's equation:

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda 57.3}{w \cos \theta}$$

Wherein k is a constant related to crystallite shape and to how w and D_{hkl} were determined (k was assumed to be 0.9 [1], λ is the X-ray wavelength, θ is the Bragg's angle and w is the pure X-ray diffraction line broadening ($w^2 = (W^2 - w_0^2)^{1/2}$; W = sample's diffraction line breadth; w_0 = standard's diffraction line breadth). The factor 57.3 was used to convert w in degrees to radian measure. Errors associated with crystallite size determinations were also computed

Field emission gun-scanning electron microscopy (FEG-SEM)

1.0 mg of material powder was weighted and placed in a 25 mL beaker containing 10 mL of solvent (0.1% (w/v) BSA solution for ZnO and isopropyl alcohol for TiO₂). Dispersion was carried out using a sonifier tip Branson model 101-147-037 (Tapped Step Horn 1/2" Tip Diameter) operating at 50% amplitude for 3 min. 0.1 mL of this dispersion then was added to 10.0 mL of pure solvent and the sonication was repeated. Immediately after, one drop of the final dispersion was poured on a silicon wafer and left to dry. Finally, they were firmly fixed on FEG-SEM sample holders using a conductive silver paint.

FEG-SEM microscope operation: FEG-SEM analyses were carried on a Jeol microscope, model JSM 6701, equipped with a field emission source (FEG – Field Emission Gun). Operation parameters are summarized on the Table (8):

Table 8. Operation parameters for FEG-SEM imaging.

Material	Acceleration Voltage (KV)	Beam current (A)	Work Distance (μm)	Spot Size
ZnO	2.0 and 10.0	10.0	3.0	7.0
TiO ₂	2.0 and 10.0	10.0	3.0	7.0 and 8.0

Specific surface area (SSA) by the BET

The specific surface area of the NMs was obtained by nitrogen physisorption method (Micromeritics ASAP 2000, using the BET isotherm). The samples were subjected to a pre-treatment in vacuum at 100°C to achieve degassing pressure below 10 μm Hg before obtaining the adsorption isotherms. About 0.2 g of material was used for the analysis that was previously deagglomerated in a mortar. The surface area was measured by complete 5 N₂ adsorption points at -196°C (liquid nitrogen bath) at the relative pressure range from 0.05 to 0.20 mmHg. The total or cumulative

pore volume and the average pore diameter were determined at a relative pressure of 0.99 mmHg.

In vitro experiment

Dispersion procedure for the DLS measurements of the ZnO and TiO₂ nanoparticles.

The DLS analysis of TiO₂ and ZnO Nanoparticles were performed in the first moment in BSA (Bovine Serum Albumin – Sigma (USA) catalogue number A-9418) solution. Nanoparticles were initially dispersed in bovine serum albumin (BSA) solution and then diluted (50% v/v) sequentially in simulated digestive fluids, after a controlled period of time, simulating the digestive tract, as showed in the Figure 5.

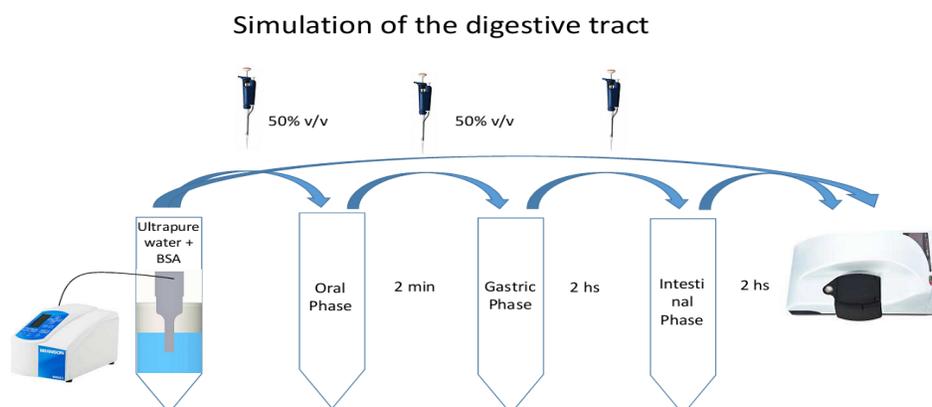


Figure 6. Scheme of the sequential dilution and dispersion followed for the TiO₂ and ZnO NPs characterizations by the DLS Technique (size measurement and Zeta potential).

The procedure concerning the BSA solution preparation was: 25 mL of deionized water was added to a 50 mL capacity flask and 50.0 mg of previously weighed BSA powder was added. The powder was solubilized by gently mixing the solvent. Water was then added until the final volume of 50 mL and homogenization was repeated till total solubilizing the BSA powder. The stock BSA solution at final concentration of 0.1% w/v was stored at 4°C for 24 h.

The dispersion was obtained by sonication on the Branson 450 sonifier, using a tapped step horn 1/2" Tip Diameter and amplitude of 50%, using a two-step procedure as follows: (i) 10.0 mg of ZnO powder (de-agglomerated in a mortar and pestle) was added to 20 mL of 0.1% (w/v) BSA solution in a 50 mL capacity glass beaker and placed into an ice/water bath. The suspension was dispersed for 3 minutes. (ii) 1.0 mL was then added to 50.0 mL 0.1% (w/v) BSA solution in a 100 mL capacity glass beaker, which was also placed in an ice/water bath and sonicated again for 3 minutes.

*Preparation of the solutions simulating biological fluids were
TiO₂ and ZnO were suspended*

- Simulated salivary fluid without enzyme (SSF): 0.19 g of monobasic potassium phosphate; 2.38 g of dibasic sodium phosphate and 8.0 g of sodium chloride were added to ultrapure water to make 1000 mL of solution. For the pH correction, phosphoric acid was used dropwise. This test solution has a pH of about 6.75.
- Simulated gastric fluid without enzyme (SGF): 2.0 g of sodium chloride and 7.0 mL of hydrochloric acid were added to a volume of ultrapure water to make 1000 mL of solution. This test solution has a pH of about 1.2.
- Simulated Intestinal Fluid without enzyme (SIF): 6.8 g of monobasic potassium phosphate were added to 260 mL of ultrapure water and mixed to complete dissolution. After this, 0.616 g of sodium hydroxide was added and the solution was completed to a total volume of 1000 mL with ultrapure water. This test solution has a pH of about 6.8 - 7.0.

In vivo experiment

The in vivo experiment was approved by the Local Animal Care and Use Committee, number 020/16. Two studies were conducted at the same time, one for the evaluation of the TiO₂ NPs and the other for the ZnO NPs. Both were carried out at Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Lavras (UFLA).

We followed the protocol established by the OECD Guideline 423 for Testing of Chemicals (13). 40 healthy young adult female BALB/c isogenic mice, weight about 14 – 24 g (7 weeks old) were obtained in the Federal University of Minas Gerais (UFMG). The animals were maintained in autoclaved polypropylene cages (414 x 344 x 168 mm), in a room with air-conditioned at 22 ± 2 °C, 50-70% relative humidity and 12 h light/dark cycle with free access to a conventional laboratory diet and water. After 5 days for the acclimatization to the laboratory conditions, the mice were randomly divided into ten groups: G1 – Control Group; G2 – 5 mg.Kg⁻¹ TiO₂ NP; G3 – 30 mg.Kg⁻¹ TiO₂ NP; G4 – 300 mg.Kg⁻¹ TiO₂ NP; G5 – 2000 mg.Kg⁻¹ TiO₂ NP; G6 – Control Group; G7 - 5 mg.Kg⁻¹ ZnO; G8 - 30 mg.Kg⁻¹ ZnO; G9 - 300 mg.Kg⁻¹ ZnO; G10 - 2000 mg.Kg⁻¹ ZnO. Each group consisted of four female mice (n=4). The food was withheld 4 hours before the administration of the doses. Following the period of fasting, the animals were weighed to adjust the dose (day 1). The animals were also weighted in the 7th and 14th days of the experiment.

In this protocol, the tested substances should be in liquid form, preferably in aqueous solutions. So, the NPs were suspended in BSA and homogenized for 16 minutes to disperse (400 Watt Branson Sonifier S-450D), following the Report “The generic NANOGENOTOX dispersion protocol” (14). The control group received an equivalent volume of BSA.

The solutions were prepared to provide the desired dose in 1mL/100g of body weight and the doses were selected following the OECD guidelines (13). Each animal received one dose of TiO₂ or ZnO NPs by gavage using a suitable intubation cannula. After dosing they were carefully observed for clinical signs and changes in behavior on the first 4 hours, each 12 h during 48 h and each 24 h until the 14th day. In the 14th day, the animals were humanely killed by cervical dislocation (15) and were subjected to gross necropsy. Samples of kidney, liver, heart, lung, spleen, pancreas, intestine, muscle, brain, lymph nodes were collected for histopathological analyses, even in the absence of macroscopic pathological changes.

Histopathology

The histopathological analyses were carried out at Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Lavras (UFLA). Small pieces of Kidney, liver, heart, lung, spleen, pancreas, intestine, muscle, brain, lymph nodes were collected 14 days after the administration. The portion of organs were fixed in 10% neutral buffered formalin solution, dehydrated in a graded series of ethanol and xylene solutions, and embedded in paraffin. Sections were cut with a microtome, deparaffinized, rehydrated in a graded series of ethanols, and stained with hematoxylin and eosin.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean values \pm standard deviations (SD). The data were analysed by means of One Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey test to determine significance relative to the unexposed control using IBM SPSS statistics version 20.0 (IBM Corporation, USA). In all cases, $p < 0.05$ was considered significant.

ACKNOWLEDGEMENTS:

NanoReg - CNPq process n. 405030/2015-0, SisNano – CNPq process n. 402287/2013-4, FAPESP, FINEP and Rede AgroNano - Embrapa.

REFERENCES:

1. Cho, W-S., Kang, B-C., Lee, J. K., Jeong, J., Che, J-H., Seok, S.H. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and Fibre Toxicology*, **10**, 1-9 (2013).

2. Baek, M., Chung, H-E., Yu, J., Lee, J-A, Kim, T-H., Oh, J-M., Lee, W-J, Paek, S-M., Lee, J. K., Jeong, J., Choy, J-H., Choi, S-J. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 3081–3097 (2012).
3. Heringa, M.B., Geraets, L., van Eijkeren, J. C. H., Vandebriel, R. J., de Jong W. H., Oomen, A. G. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. *Nanotoxicology*, 1-11, 2016.
4. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, **311**, 622-627 (2006).
5. Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Eric Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J-P., Carrière, M. Audinot, J-N., Pierre, F. H., Guzylack-Piriou, L., Houdeau, E. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* **7**, 40373 (2017).
6. Wang, B., Feng, W-Y., Wang, T-C., Jia, G., Wang, M., Shi, J-W., Zhang, F., Zhaoa, Y-L., Chai, Z-F. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicology Letters* **161**, 115–123 (2006).

7. Auplat C., Slimane, S.B. Regulation and innovation dynamics for nanoresponsible development: The case of the French code de l'environnement L 523-1 to L 523-5. *Journal of Physics: Conference Series* 2015, **617**. doi:<10.1088/1742-6596/617/1/012038 (2015).
8. Fröhlich, E., Roblegg E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* **291**, 10– 17 (2012).
9. Warheit, D., Boatman, R, Brown, S., Developmental toxicity studies with 6 forms of titanium dioxide test materials (3 pigment-different grade & 3 nanoscale) demonstrate an absence of effects in orally-exposed rats, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (2015), doi:10.1016/j.yrtph.2015.09.032.
10. Wang, B., Feng, W., Wang, M., Wang, T., Gu, Y., Zhu, M., Ouyang, H., Shi, J., Zhang, F., Zhao, Y., Chai, Z, Wang, H., Wang, J. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *J Nanopart Res* **10**, 263–276, (2008)
11. Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol* **11**, 30 (2014).
12. Pasupuleti, S., Alapati, S., Ganapathy, S., Anumolu, G., Pully, N.R., Prakhya, B.M. Toxicity of zinc oxide nanoparticles through oral route. *Toxicology and Industrial Health* **28**, 675–686, (2012).

13. OECD Guideline for the Testing of Chemicals - Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method - OECD 423, Adopted in 17th December 2001.
14. Jensen, K.A. The NANOGENOTOX dispersion protocol for NANoREG. NANoREG WP2. 11 pp (2014).
15. Cressey, D. Best way to kill lab animals sought. *Nature*, **500**, 130-131 (2013).