



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL**

**GABRIELA IANTORNO DE SOUZA**

TERESINA

2024

**GABRIELA IANTORNO DE SOUZA**

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR  
MEIO DO USO DE FILMES POLIMÉRICOS ASSOCIADOS OU NÃO COM  
SAFRANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical - PPGZT da Universidade Federal do Piauí-UFPI, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Marco Túlio Costa Almeida.

TERESINA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial CCA  
Serviço de Representação Temática da Informação

S725i Souza, Gabriela Iantorno de.  
Inativação fotodinâmica in vitro de *Staphylococcus aureus* por meio do uso de filmes poliméricos associados ou não com safranina / Gabriela Iantorno de Souza. -- 2024.  
48 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical, 2024.  
“Orientador: Prof. Dr. “Marco Túlio Costa Almeida.”

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Microrganismos. 3. Polímeros. 4. Formulação - safranina. I. Almeida, Marco Túlio. II. Título.

CDD 636.208

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**GABRIELA IANTORNO DE SOUZA**

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR  
MEIO DO USO DE FILMES POLIMÉRICOS ASSOCIADOS OU NÃO COM  
SAFRANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical – PPGZT da Universidade Federal do Piauí-UFPI, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Marco Túlio Costa Almeida.

Aprovada em 26/02/2024

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente



**MARCO TULIO COSTA ALMEIDA**  
Data: 18/04/2024 08:59:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marco Túlio Costa Almeida

Universidade Federal do Piauí

Orientador

Documento assinado digitalmente



**MIGUEL ARCANJO MOREIRA FILHO**  
Data: 18/04/2024 08:09:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr. Miguel Arcanjo Moreira Filho

Universidade Federal do Piauí

Examinador Interno

Documento assinado digitalmente



**ROBERTA DE LIMA VALENÇA**  
Data: 17/04/2024 22:05:44-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa.Dra. Roberta de Lima Valença

Universidade Federal do Espírito Santo

Examinadora Externa ao Programa

Dedico a minha avó, mãe e tio (*in memoriam*) por me apoiarem em todas as escolhas e por serem a melhor família que eu poderia ter. Tudo por e para vocês.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu amor infinito e por ser meu sustento mediante todas as tribulações.

À minha mãe, Renata Iantorno por sempre me incentivar a voar, acreditar nas minhas escolhas e abdicar de suas vontades para que eu pudesse ter as minhas. Por toda paciência, por ser minha melhor amiga, por ouvir meus desabafos, por rir e chorar comigo e por me mostrar que somos capazes, basta querermos e irmos atrás. Grata por eu ter sido escolhida para ser sua filha. Te amo!

À minha avó, Aneza Iantorno conhecida como Dona Didi, por ter me criado, dado suporte em todas as escolhas, por ser minha melhor amiga e confidente. Grata por tudo e espero um dia poder retribuir parte do que fez e faz por mim. Te amo!

Ao meu tio (*in memoriam*), Alexsandro Iantorno por ter exercido o papel de pai enquanto esteve presente. Por ter sido meu maior incentivador e por dizer sim a todas as minhas escolhas. Sinto sua presença em todos os momentos e sei que onde estiver, está torcendo pelo meu sucesso. Sempre em meus pensamentos e orações. Te amo para além da eternidade!

À minha irmãzinha Laura Iantorno, carinhosamente chamada de Laurinha, por fazer meus dias felizes desde a sua chegada e ser um dos motivos para que eu siga nessa jornada.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Marco Túlio Costa Almeida, pelo exemplo de determinação, garra, sabedoria, resiliência, paciência e, sobretudo, empatia. Obrigada por me acolher tão bem, por acreditar em mim e embarcar comigo nessa jornada. Gratidão por toda convivência, parceria, ensinamentos, ajudas, amizade, oportunidades de crescimento profissional e pessoal e por toda orientação. Não há palavras que consigam mensurar tamanha gratidão. Ao senhor, registro o meucarinho.

À minha Istefane Rodrigues, por ser amiga, irmã, ouvinte, conselheira e por todo cuidado, carinho e me apoiar nas minhas escolhas. Sua amizade foi e é um presente de Deus. Ah, grata também por me presentear com a amizade de Afonso, que virou um irmão também. Vocês foram fundamentais nesse processo.

Ao meu amigo Allison Queiroz, pela parceria, ajuda, apoio nas minhas escolhas, por ouvir minhas lamúrias e por dizer “Gabi, você é capaz”. Sua amizade é valiosa. Grata por tudo.

À Karina Nascimento, Lucas Costa, Bruna Souza, Mateus Rodrigues, Brunella Matias, Conrado Pedrosa, Debora Tonolli, Cintia Carine, Fábio Novaes, Talita Perígolo, Luan Camboim, Iara Souza, Yamid Andrés Perilla Melo e a Romilda Rodrigues minha eterna gratidão por toda ajuda, apoio e palavras de incentivo.

Ao Janderlei, pelo desenvolvimento do aplicador *dipping* com LED, que foi fundamental para a pesquisa. E também à toda equipe da UEPA/Incaper de Linhares, em especial à Pesquisadora Mércia Regina Pereira de Figueiredo por todo incentivo.

À toda equipe dos laboratórios de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos e Grupo Aplicado em Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo, pela parceria e ajuda para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários da fazenda experimental da Universidade Federal do Espírito Santo, em especial Gilberto, Patrick e Sandro, por me possibilitarem crescimento profissional. Grata por todos os conhecimentos compartilhados.

À Universidade Federal do Espírito Santo e do Piauí pelas oportunidades e por permitirem minha ascensão acadêmica.

E por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento da bolsa de estudo.

“Não pense nos momentos difíceis como o fim do mundo, e sim como mais um obstáculo a ser superado. Pois é dos momentos difíceis que se cresce.” (Isadora Borges)

## RESUMO

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, considerada uma patologia complexa, de caráter multifuncional e bastante difundida nos rebanhos leiteiros, sendo o principal patógeno responsável o *Staphylococcus aureus*. Como alternativa para tratamento de infecções oriundas por microrganismos, surge a inativação fotodinâmica de microrganismos (IFMO), que visa na combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular, os quais juntos produzam espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam a morte celular do alvo. Sendo assim, objetivou-se avaliar o uso de filmes poliméricos associado ou não ao fotossensibilizador safranina na IFMO em cepas de *Staphylococcus aureus*. Foram preparadas quatro formulações de filmes poliméricos associados ou não com a safranina, sendo poli(álcool vinílico) (PVA), poliacrilato de sódio e safranina (formulação 1), PVA e poliacrilato de sódio (formulação 2), PVA e safranina (formulação 3) e PVA (formulação 4), sob irradiação (1 e 5 minutos) ou não da luz LED verde 5mm ( $\lambda = 520\text{nm}$ ) acoplada a um frasco aplicador *dipping*, com potência ótica de 64mW, levando a uma dose de energia de  $19,2\text{J}/\text{cm}^2$ . A atividade antimicrobiana foi realizada seguindo o protocolo da farmacopeia brasileira, utilizando cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), sendo preparadas diluições seriadas ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em duplicata e adicionado 100 microlitros de cada diluição na superfície de placas contendo ágar nutriente. O período de incubação foi de  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  por 24 horas e realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados obtidos *in vitro* foram analisados sob delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial ( $2 \times 3 \times 2$ ) por meio da técnica de modelos generalizados lineares e para comparação de médias teste de Tukey 5%, usando o software R versão 4.3.1. A formulação 1 apresentou inibição total no crescimento microbiano sem ou com a presença da luz, sendo diferente no tempo de 1 minuto nas diluições 1 ( $10^{-2}$ ) e 2 ( $10^{-3}$ ). Para a formulação 2, em todos os níveis de exposição à luz (0, 1 e 5 minutos) e na ausência de luz, houve crescimento microbiano, porém no menor tempo foi observado redução da carga bacteriana na diluição 2. Na formulação 3, não foi observado crescimento microbiano tanto na ausência quanto na presença de luz e independente da diluição. E, em contrapartida na formulação 4 houve crescimento bacteriano sem exposição à luz e com níveis de exposição de 1 e 5 minutos, apresentando redução da contagem de microrganismos no tempo de 1 minuto. As formulações contendo

safranina e sem presença de luz reduziram a carga de *Staphylococcus aureus*, sendo uma alternativa para a prevenção da mastite e filmes sem safranina e com exposição à luz no tempo de 1 minuto, diminuiu a contagem de microrganismos.

**Palavras-chave:** Formulação. Microrganismos. Polímeros. Terapia Fotodinâmica.

## ABSTRACT

Mastitis is defined as an inflammation of the mammary gland, considered a complex pathology, multifunctional in nature and quite widespread in dairy herds, with the main pathogen responsible being *Staphylococcus aureus*. As an alternative for treating infections caused by microorganisms, photodynamic inactivation of microorganisms (IFMO) appears, which aims to combine light, photosensitizer (PS) and molecular oxygen, which together produce reactive oxygen species (ROS), which cause target cell death. Therefore, the objective was to evaluate the use of polymeric films associated or not with the photosensitizer safranin in IFMO in strains of *Staphylococcus aureus*. Four formulations of polymeric films associated or not with safranin were prepared, being polyvinyl alcohol (PVA), sodium polyacrylate and safranin (formulation 1), PVA and sodium polyacrylate (formulation 2), PVA and safranin (formulation 3) and PVA (formulation 4), under irradiation (1 and 5 minutes) or not with 5mm green LED light ( $\lambda = 520\text{nm}$ ) coupled to a dipping applicator bottle, with an optical power of 64mW, leading to an energy dose of 19, 2J/cm<sup>2</sup>. The antimicrobial activity was carried out following the Brazilian pharmacopoeia protocol, using a strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), serial dilutions ( $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) were prepared in duplicate and 100 microliters of each dilution were added to the surface of plates containing agar. nutrient. The incubation period was  $35 \pm 2^{\circ}$  C for 24hours and the number of colonies forming units (CFU) was counted. The data obtained in vitro were analyzed under a completely randomized design in a factorial scheme (2x3x2) using the generalized linear model technique and for comparison of means the 5% Tukey test, using the software R version 4.3.1. Formulation 1 showed total inhibition of microbial growth without or with the presence of light, being different in a time of 1 minute in dilutions 1 ( $10^{-2}$ ) and 2 ( $10^{-3}$ ). For formulation 2, at all levels of exposure to light (0, 1 and 5 minutes) and in the absence of light, there was microbial growth, but in the shortest time a reduction in bacterial load was observed in dilution

2. In formulation 3, there was no microbial growth was observed both in the absence and presence of light and regardless of dilution. And, on the other hand, in formulation 4 there was bacterial growth without exposure to light and with exposure levels of 1 and 5 minutes, showing a reduction in the count of microorganisms within 1 minute. Formulations containing Safranin and without the presence of light reduced the load of *Staphylococcus aureus*, being an alternative for the prevention of mastitis and films

without Safranin and with exposure to light for 1 minute reduced the count of microorganisms.

**Keywords:** Formulation. Microorganisms. Polymers. Photodynamic Therapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos diferentes receptores de reconhecimento de padrões ancorados na membrana celular e seus respectivos ligantes.....	22
Figura 2. Representação do Programa seis pontos para o controle da mastite .....	24
Figura 3. Esquema de Jablonski para obtenção de processos fotodinâmicos através da transferência de energia para produção de espécies reativas de oxigênio .....	26
Figura 4. Modo de ação dos filmes poliméricos.....	28
Figura 5. Blenda polimérica contendo safranina sob placa de vidro (A) e filme com Safranina 0,84% cortado (B). .....	39
Figura 6. Preparo do inóculo na escala McFarland .....	39
Figura 7. Tubo de ensaio contendo inóculo sob irradiação .....	40
Figura 8. Protocolo do experimento.....	41
Figura 9. Intervalo de confiança e comparação pelo teste de Tukey das médias de contagem de UFC's entre os níveis de diluições em relação à cada combinação de formulação e tempo de exposição à luz. ....	42
Figura 10. Intervalo de confiança e comparação pelo teste de Tukey das médias de contagem de UFC's entre os níveis de diluição em relação a cada combinação de formulação e tempo de exposição à luz. ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escore do teste CMT e os valores aproximados de contagens de células somáticas presentes no leite.....	20
Tabela 2. Exemplos dos principais patógenos da mastite bovina .....	20
Tabela 3. Recentes estratégias para controle da mastite bovina .....	23
Tabela 4. Composição qualitativa e quantitativa das formulações selecionadas com safranina a 0,84% p/p .....	38
Tabela 5. Média e desvio padrão das formulações 1 e 2 .....	42
Tabela 6. Média e desvio padrão das formulações 3 e 4 .....	44

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	15
CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
1 MASTITE BOVINA .....	19
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.2 Tratamento e controle da mastite .....	22
1.3 Inativação fotodinâmica de microrganismos .....	24
2 FOTOSSENSIBILIZADORES .....	27
3 FILMES POLIMÉRICOS .....	28
4 REFERÊNCIAS .....	29
CAPÍTULO 2. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> POR MEIO DO USO DE FILMES POLIMÉRICOS ASSOCIADOS OU NÃO COM SAFRANINA .....	34
Resumo .....	35
Introdução .....	36
Material e métodos .....	36
Local do experimento e delineamento experimental .....	37
Blendas poliméricas .....	37
Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos filmes sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
Análise Estatística .....	41
Resultados e discussão .....	42
Conclusão .....	46
Contribuição dos autores .....	46
Referências .....	47

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária leiteira é de grande importância econômica e social para o Brasil, por ser grande geradora de renda e emprego, além disso o leite e seus derivados constituem uma das principais fontes de proteína e cálcio na dieta da população brasileira (NETTO; GOMES, 2021). No quarto trimestre de 2023, foram produzidos aproximadamente 6 bilhões de litros de leite (IBGE, 2023). Todavia, algumas patologias podem ocasionar prejuízos na produção leiteira, como a mastite, que causa redução na produtividade, qualidade do leite e elevados custos com tratamentos (BRITTO; BRITTO, 2021).

A mastite é caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, ou seja, é uma patologia complexa de caráter multifuncional e bastante difundida nos rebanhos leiteiros. Abrange vários fatores, como, a diversidade de patógenos, relacionados ao ambiente e ao animal, sendo esses influenciados pelo manejo adotado (MENEZES; MILHOMEM; SILVA, 2023).

Os patógenos que causam a mastite são divididos em dois grupos: os que tem maior afinidade pela glândula mamária, denominados de contagiosos e os que estão presentes nos mais diversos ambientes da propriedade, chamados de ambientais, sendo esses presentes na água contaminada, fezes, solo, equipamentos de ordenha, animal e ordenhador. Vale ressaltar que essa transmissão ocorre principalmente durante a ordenha, por isso, são necessárias práticas higiênico-sanitárias e realização correta do *pré* e *pós-dipping* (BRITO; BRITO, 2000).

A ocorrência da mastite está associada ao manejo antes, durante e após a ordenha, por isso a importância de adotar práticas que permitam prevenir a mastite, desde a conscientização do ordenhador em relação a higiene das mãos, limpeza do ambiente, do animal, de todos os objetos usados na ordenha, limpeza correta do úbere e tetos até a realização de testes para monitoramento da mastite clínica ou subclínica (WEIS *et al.*, 2022).

Além das práticas convencionais de prevenção, surge a Terapia Fotodinâmica como alternativa a estas, dado que, sua ação é rápida e não seleciona microrganismos resistentes. Por isso, é fundamental que haja identificação de uma técnica eficiente,

para evitar a seleção de populações microbianas resistentes aos fármacos disponíveis no mercado e reduzir o risco de resíduos no leite (SELLERA *et al.*, 2016).

A Terapia Fotodinâmica (TFD), consiste na associação de um fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e irradiação de luz visível de comprimento de onda adequado, para produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam a morte celular do alvo (SILVA JUNIOR *et al.*, 2019). É uma técnica que, vem sendo empregada para tratamento dos mais variados tipos de câncer e atualmente no combate a microrganismos, sendo nominada de Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFMO). Para elucidar a IFMO no combate de microrganismos, há um avanço nas pesquisas no desenvolvimento de formulações, síntese de novos compostos fotossensibilizantes e dispositivos de luz (GONÇALVES *et al.*, 2020). Outra técnica promissora para prevenção de microrganismos que causam patologias em animais, são formulações a partir de filmes poliméricos.

O uso de filmes poliméricos configura uma possibilidade de prevenção em relação aos convencionais, pois torna o processo cômodo e prático, dado que são translúcidos, possibilitando visibilidade da lesão, podendo ser aplicados facilmente em lesões de maiores dimensões e de fácil eliminação. No caso de lesões ocasionadas pela mastite, protege a área lesionada como uma barreira física e mecânica, impossibilitando a propagação de microrganismos. Além do mais, possuem a aptidão de liberar o fármaco de forma moderada e duradoura, com isso minimiza a quantidade administrada, impede dor e avarias no procedimento de cicatrização no período de retirada, fomentando a maior aderência do paciente ao tratamento (OSHIRO JUNIOR; SHIOTA; CHIAVACCI, 2014).

Em estudo recente *in vitro* e *in vivo*, Rodrigues *et al.* (2023) comprovaram a eficácia da safranina na concentração de 300 µg/mL incorporada em copolímeros de Pluronic (F127) usada como fotossensibilizador na inativação de *S. aureus* e *Pseudomonas fluorescens* e houve diminuição no número de células somáticas de leite quando usada como *pós-dipping* em cabras.

No entanto, são inéditos estudos relacionados a utilização de filmes de poli(álcool vinílico) (PVA) e poliacrilato de sódio com o corante safranina aliado a Inativação Fotodinâmica de Microrganismos voltados para a prevenção da mastite em animais ruminantes, sendo assim, hipotetiza-se que as formulações contendo

safranina sejam eficazes com o uso da luz. Desse modo, objetivou-se avaliar o uso de filmes poliméricos associados ao fotossensibilizador safranina (0,84% p/p) na IFMO *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus*. A dissertação foi estruturada conforme as normas para elaboração de dissertações do Programa de Pós- Graduação em Zootecnia Tropical da UFPI da seguinte forma: INTRODUÇÃO GERAL; CAPÍTULO 1 – Referencial teórico elaborado de acordo com as normas da ABNT; CAPÍTULO 2 – artigo científico intitulado: “Inativação fotodinâmica *in vitro* de *Staphylococcus aureus* por meio do uso de filmes poliméricos associados ou não com safranina” elaborado de acordo com as normas da Revista *Scientia Agrícola*, exceto idioma e ordem de inclusão das tabelas e figuras.

## **CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1 MASTITE BOVINA

A mastite se manifesta por meio da inflamação do tecido mamário devido à infecção causada por microrganismos, como bactérias, fungos, leveduras e algas, que tem por finalidade eliminar os agentes patogênicos, neutralizar as toxinas e regenerar os tecidos afetados (DIAS *et al.*, 2020). Em situações de infecção, os patógenos podem penetrar a glândula mamária por duas vias, a ascendente, tendo como principais bactérias os estafilococos, estreptococos e coliformes, e a descente onde a infecção se dá pela via hematogena ou linfática, podendo ser classificada em clínica ou subclínica (COSTA & DIAS, 2013).

Considerada de fácil diagnóstico, na mastite clínica os animais apresentam sinais clínicos evidentes como, úbere avermelhado, inchado, aumento de temperatura, endurecimento, dor e sensibilidade, além da presença de grumos, pus e ou sangue no leite. Alterações comportamentais também podem ser observadas, pois o animal pode diminuir o consumo de alimentos, ter febre, desidratação e reduzir drasticamente a produção de leite (DIAS *et al.*, 2020).

Quanto à mastite subclínica, uma característica marcante é a ausência de sinais clínicos e modificações visíveis no leite. Sendo essa, a principal causa de perda para os produtores, pois ocorre de forma silenciosa, por isso é importante a realização do controle leiteiro da propriedade semanalmente (DIAS *et al.*, 2020). As alterações são químicas e microbiológicas, ocasionando aumento na contagem de células imunológicas e células do epitélio descamado (SILVA *et al.*, 2019).

Para o diagnóstico da mastite são realizados dois testes, o da caneca de fundo preto, método que consiste na eliminação dos três primeiros jatos de leite de cada teto em caneca, usado para detecção da mastite clínica e o “California Mastitis Test”, conhecido como CMT, usado para identificação da mastite subclínica, que indica a enfermidade através da contagem de células somáticas (CCS) sendo estimadas por meio de escores oriundos da viscosidade do gel formado (DURR, 2012).

O mecanismo de ação consiste na associação de um detergente aniônico, que rompe as membranas das células somáticas presentes no leite, de modo que libera o RNA dessas células. O RNA quando em contato com o reagente, forma um “gel” na raquete, sendo esse teste realizado na sala de ordenha. O grau de viscosidade do

gel, irá depender da quantidade de células somáticas existentes nas amostras de leite (Tabela 1, MAIOCHI *et al.*, 2019; MASSOTE *et al.*, 2019).

Tabela 1. Escore do teste CMT e os valores aproximados de contagens de células somáticas presentes no leite.

Escore CMT	Formação de gel	Células somáticas por mL
0	Ausência	0 a 200.000
Traços	Pequena formação	150.000 a 500.000
+	Pequena a moderada	400.000 a 1.500.000
++	Moderada	800.000 a 5.000.000
+++	Consistente	>5.000.000

Fonte: Adaptado de Maiochi *et al.* (2019).

Inúmeros agentes etiológicos causadores da mastite são conhecidos, aproximadamente 137 espécies de microrganismos, entre bactérias, leveduras e algas. O principal grupo é o das bactérias, sendo composto por bastonetes gram-positivos (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Escherichia coli*) e gram-negativos (MUSHTAQ *et al.*, 2018). Com isso, é possível classificar os agentes etiológicos em contagiosos ou ambientais, de acordo com a origem e modo de transmissão (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos dos principais patógenos da mastite bovina.

Patógeno	Contagioso	Ambiental
<i>Staphylococcus aureus</i>	X	
<i>Escherichia coli</i>		x
<i>Streptococcus agalactiae</i>	X	
<i>Klebsiella spp.</i>		x
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	X	
<i>Citrobacter spp.</i>		x
<i>Mycoplasma spp.</i>	X	
<i>Enterobacter spp.</i>		x

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2020).

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

Os patógenos que causam a mastite são divididos em contagiosos e ambientais. Os contagiosos encontram-se no úbere, vivem e propagam-se na parte externa ou interna da glândula mamária e na pele do teto da vaca, disseminam-se de animal para animal ou de teto para teto durante o manejo de ordenha (ACOSTA *et al.*, 2016; CHENG; HAN, 2020). Sendo o *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium* os de maiores ocorrências (ASHAF; IMRAN, 2020; CHENG; HAN, 2020). Já os ambientais ou também oportunistas, vivem no ambiente em busca de chances para causar infecção, por exemplo, no momento da ordenha podem entrar no teto em decorrência da abertura do esfíncter ou também quando a imunidade do animal está baixa, ocasionando a mastite clínica (CHENG; HAN, 2020).

O gênero *Staphylococcus* divide-se em dois grandes grupos: coagulase negativa (SCN) e coagulase positiva (SCP), ambas fazem com que os microrganismos produzam a enzima coagulase que transforma o fibrinogênio em fibrina (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). O grupo de maior relevância é o SCP, que é composto pelo *Staphylococcus aureus*, sendo um dos principais causadores de mastite no Brasil.

Entre essas bactérias, o *Staphylococcus aureus* é o agente responsável por danos mais severos de mastite clínica ou subclínica, culminando na queda de produção de leite e aumento no número de células somáticas. A infecção por *S. aureus* decorre de um feedback relacionado a imunidade inata muito lenta ou muitas vezes não observável (PETZL *et al.*, 2008; BANNERMAN, 2009). Pesquisas revelam que, o possível motivo em relação ao comportamento distinto da resposta imune intramamária deve-se à sinalização do Toll-like receptor (TLR) induzida por bactérias Gram-negativas (ASHAF; IMRAN, 2020). As bactérias Gram-positivas, como é o caso da *S. aureus*, não conseguem induzir a resposta de sinalização TLR, e por esse fato culmina em uma resposta lenta ou moderada no sistema imunológico do hospedeiro (ASKARIAN *et al.*, 2018).

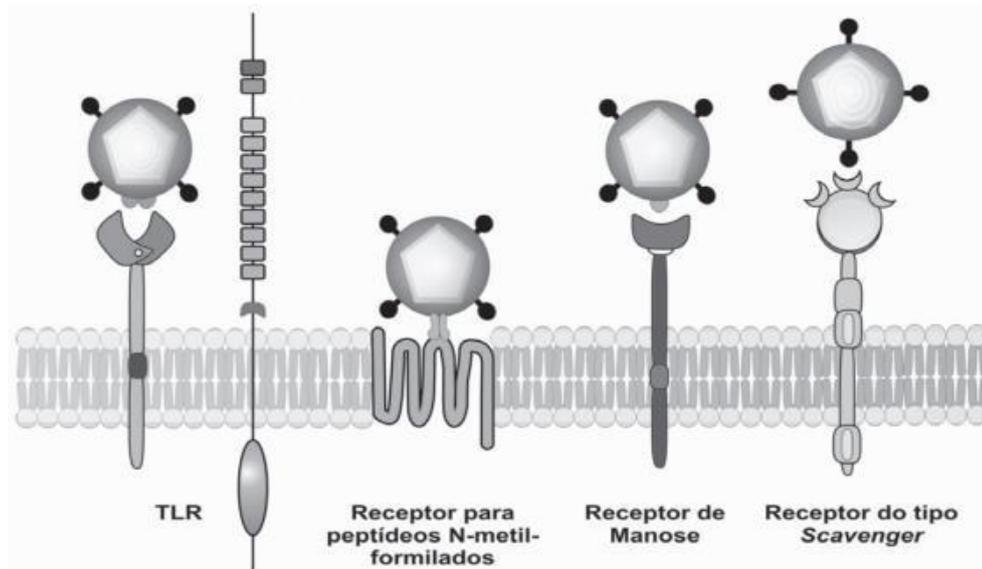


Figura 1. Representação esquemática dos diferentes receptores de reconhecimento de padrões ancorados na membrana celular e seus respectivos ligantes.

Fonte: CRUVINEL *et al.*, 2001.

## 1.2 Tratamento e controle da mastite

A mastite bovina é considerada a patologia que mais ocasiona prejuízos econômicos na indústria de laticínios. Com isso, alternativas para controle e tratamento vêm sendo estudadas (LANGONI *et al.*, 2017). A antibioticoterapia é o método mais utilizado e amplamente difundido, considerado a principal estratégia para o tratamento de mastite. Porém, o uso excessivo e indiscriminado dos antibióticos, pode ocasionar o surgimento da resistência dos princípios ativos disponíveis no mercado e dos patógenos causadores da mastite (GOMES; HENRIQUES, 2015).

Outro fator de suma importância, é em relação aos patógenos que coabitam o interior da glândula mamária, chamados de intracelulares, tornam mais dificultoso o processo de combate, pelo fato de formarem abscessos e esses impedirem seu contato com os antibióticos. Por isso, evidencia-se a demanda por novas estratégias para o tratamento da mastite (Tabela 3, GOMES; HENRIQUES, 2015; SANKAR, 2016).

Tabela 3. Recentes estratégias para controle da mastite bovina.

<b>ESTRATÉGIAS</b>
Nanopartículas
Vacinas
Antimicrobianos derivados de plantas
Antimicrobianos derivados de animais
Antimicrobianos derivados de bactérias
Citocinas
Bacteriófagos
Terapia fotodinâmica

Fonte: Adaptado de Gomes e Henriques (2015); Sankar (2016); Sellera *et al.* (2016).

Aliado ao tratamento farmacológico, medidas profiláticas são adotadas, com a finalidade de reduzir a carga bacteriana nos tetos. Denominada de *pré-dipping* ou pré-imersão, os tetos são imergidos em solução desinfetante antes da ordenha, sendo os mais utilizados o hipoclorito de sódio, iodo e clorexidina (LOPES *et al.*, 2020). E ao término da ordenha, é feito novamente o processo mencionado anteriormente, porém nominado de *pós-dipping*, sendo esse de maior importância, devido ao esfíncter do teto encontrar-se aberto e culminar em maior suscetibilidade a entrada de patógenos causadores da mastite, como o *Staphylococcus aureus* (GOMES; HENRIQUES, 2015; SANKAR, 2016; FONSECA *et al.*, 2021).

Para um controle efetivo da mastite, é necessária uma visão holística de todo o processo produtivo e a adoção de medidas preventivas. Arcanjo *et al.* (2017), apresentou um programa denominado de “Programa dos seis pontos no controle da mastite bovina”. O mesmo consiste em pontos específicos, sendo esses considerados críticos de uma fazenda e que necessitam de atenção (Figura 2).



Figura 2. Representação do Programa seis pontos para o controle da mastite.

Fonte: Adaptado de Arcanjo (2017).

### 1.3 Inativação fotodinâmica de microrganismos

A história relacionada ao uso fotodinâmico para tratamentos de doenças, começou em 1900 por um estudante de medicina chamado Oscar Raab e por seu professor Hernann Von Tappeiner, em Munique. Foi avaliada a eficácia do corante acridina em culturas de paramécios, sendo letal a interação do corante com a luz para a população de protozoários (SELLERA *et al.*, 2015).

O primeiro livro publicado relacionado ao tratamento de doenças mediante exposição à luz, foi em 1901 por Niels Finsen denominado de “Phototherapy” e, em 1903 dois anos após o mesmo foi honrado com o Prêmio Nobel na área de Medicina, por pesquisas com fototerapia relacionada ao controle de sintomas da tuberculose, doença comum na época (PENG *et al.*, 1996; ALLISON *et al.*, 2004).

Em 1903, o pesquisador Hernann Von Tappeiner constatou que era imprescindível a presença de oxigênio para estimular respostas aos tratamentos mediados por luz, sendo assim, foi originado o termo “Terapia Fotodinâmica”, conhecida normalmente pela sigla PDT (Photodynamic Therapy) usado até os dias atuais. No mesmo ano Hernann Von Tappeiner e Jesionek averiguaram a utilização

da eosina e luz para tratar tumores de pele (DOUGHERTY *et al.*, 1978; PENG, 1996; ALLISON *et al.*, 2004; KESSEL, 2004; BABILAS *et al.*, 2005).

A partir da década de 70, foram sendo feitas descobertas clínicas para o tratamento do câncer, e o pioneiro nas pesquisas foi Thomas Dougherty com o uso em larga escala de formulações derivadas da hematoporfirina, de acordo com as normas especificadas pela Food and Drug Administration (FDA, KESSEL, 2004). Foram observados casos de resistência microbiana aos antibióticos, anos após a descoberta de Alexandre Fleming, no ano de 1928. Todavia, foram desencadeadas várias pesquisas que perduram até os dias de hoje, relacionadas a terapia fotodinâmica para o controle de microrganismos (SELLERA *et al.*, 2014).

A terapia fotodinâmica (TDF) ou inativação fotodinâmica (IFD), é uma modalidade que corresponde a associação de um corante fotossensível, denominado de fotossensibilizador, que é ativado na presença de uma luz visível de comprimento de onda apropriado. Essa combinação culmina em reações que produzem respostas tóxicas, ou seja, espécies reativas de oxigênio (EROs), que tem capacidade de comprometer a estrutura das células, ocasionando em morte celular (MAISCH, 2009).

A ação fotodinâmica da TDF acontece quando a molécula do fotossensibilizador capta fótons, enviados pela fonte de luz com comprimento de onda específico, transpondo da sua condição fundamental para uma condição excitada. Neste instante, pode acontecer a transformação de energia através de procedimentos de fluorescência ou conversão interna da condição excitada para a de fundamental e/ou levar a molécula para o estado excitado tripleto. Quando as moléculas do fotossensibilizador encontram-se nas condições citadas anteriormente, são capazes de interagirem com o meio através de dois mecanismos diferentes, denominados tipo I e tipo II. O tipo I, sucede de reações de transferência de elétrons que acontece entre o fotossensibilizador e o substrato, gerando espécies de radicais livres. Já o tipo II, acontece a transferência de energia do fotossensibilizador ao oxigênio para a condição fundamental, formando o oxigênio singleto (WILSON, PATTERSON, 2008; MELO, 2013, Figura 03).

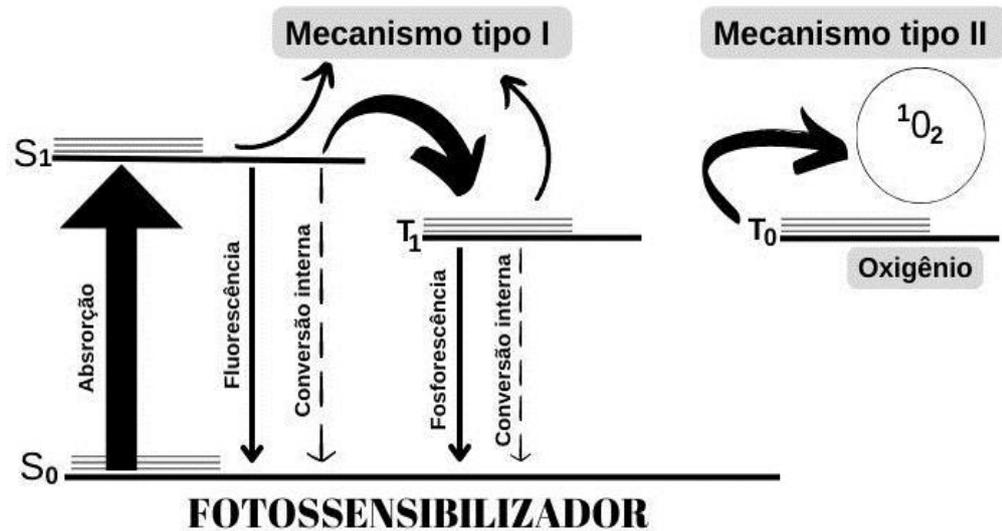


Figura 3. Esquema de Jablonski para obtenção de processos fotodinâmicos através da transferência de energia para produção de espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptado de Silva (2007).

O oxigênio singleto tem interação com praticamente todos os constituintes celulares, visto que, as moléculas insaturadas são, de modo geral, passíveis à sua ação. A membrana celular é a primeira barreira para o oxigênio singleto, devido a presença de lipídeos insaturados que serão danificados. Os hidroperóxidos oriundos podem formar EROS através de reações catalíticas, uma vez que a reatividade das EROS com compostos orgânicos é algo não específico, podendo qualquer macromolécula no interior da célula torna-se um alvo para a TDF. Deste modo, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência, ocasionando na morte celular (CARRÉ *et al.*, 1999).

As três principais fontes de luz utilizadas na TFD são, laser, LED e as lâmpadas halógenas (NAGATA *et al.*, 2012). Os lasers têm particularidades específicas, como monocromaticidade, colimação e coerência, sendo capaz de agir com profundidade e de forma mais localizada. Já os LED's conseguem emitir fótons dentro de um mesmo comprimento de onda, entretanto atuam de maneira superficial e em uma área superior (EDUARDO *et al.*, 2015).

## 2 FOTOSSENSIBILIZADORES

Os fotossensibilizadores (FS), são moléculas que conseguem interagir com a luz e originar as EROS, sendo essas tóxicas aos tecidos vivos e com capacidade de indução à morte das células por meio de necrose ou apoptose (MACHADO, 2000). As características ideais de um FS, é ter baixa toxicidade após administração, de modo que, não proporcione efeito adversos no hospedeiro, como reação alérgica, ser puro, hidrossolúvel, facilmente sintetizado e eliminado de forma rápida pelo organismo do hospedeiro, biologicamente estável, possuir alto rendimento quântico e ser seletivo para as células alvo (GARCEZ *et al.*, 2003; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Com isso, inúmeros compostos que possuem atividade fotodinâmica vem sendo investigadas.

Os fotossensibilizadores mais pesquisados e utilizados são os oriundos da hematoporfirina, fenotiazinas (azul de metileno e azul de toluidina, cianinas, fitoterápicos (azuleno) e as ftalocianinas (GARCEZ *et al.*, 2003). No entanto, algumas substâncias vem sendo estudadas, como a safranina, conhecida como Safranina-O, corante biológico que pertence à classe das fenazinas, usado nas indústrias têxtil, de papel, cosmética, processos de histologia e citologia e também para as colorações de Gram. Apresenta caráter anfifílico, ou seja, apresenta características hidrofílicas e hidrofóbicas, não gera toxicidade e gera fortemente as EROS, que causam a inativação dos microrganismos, por meio da morte celular (SILVA JUNIOR *et al.*, 2019).

O modo de ação da fotossensibilização nas bactérias (gram-positivas e gram-negativas), está correlacionado com a carga do FS, de maneira que os que dispõem carga neutra ou positiva interagem de forma eficiente e inativam as Gram-positivas, à medida que interagem em qualquer extensão da membrana externa de Gram-negativas. A camada de peptidoglicano e ácido lipoteicóico na membrana externa de Gram-positiva proporciona a difusão do FS, porém, a membrana externa de bactérias Gram-negativas atua como uma barreira física e funcional no meio das células (WAINWRIGHT *et al.*, 1997; HAMBLIN; HASAN, 2004).

### 3 FILMES POLIMÉRICOS

Os polímeros caracterizam-se como excipientes usados na elaboração de diversos medicamentos e também na indústria cosmética. É definido como excipiente toda e qualquer substância que é adicionada nas formuladas farmacêuticas, tendo diversas intenções, como, garantir estabilidade física, química e microbiológica aos produtos desenvolvidos, além de contribuir na preparação, disponibilidade do ativo no organismo, dentre outras características (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Os filmes são classificados como dissolvíveis, desintegram-se e dissolvem-se de forma rápida, quando administrados por vias bucal, tópica, vaginal, entre outras. Para a preparação desses filmes, pode ser usadas diversas matrizes poliméricas hidrossolúveis, como, éteres de celulose, polissacarídeos, poli(álcool vinílico) (PVA), poli(óxido de etileno) (PEO), PVP e copovidona (HARIRAN & BOGUE, 2009). O uso de filmes tem aplicação em diversas áreas, porém nos últimos anos tem sido empregada na medicina veterinária para prevenção de doenças, como a mastite, nesse sentido, tem por finalidade acelerar o processo curativo e de cicatrização, além de serem atóxicos, rápida evaporação, baixo custo e alta eficiência (CHEN; LIU, 2016).

O método para obter os filmes poliméricos, consiste na moldagem e evaporação, sendo esse simples, rápido e barato (BOATENG *et al.*, 2009; SUKSAEREE *et al.*, 2021). A preparação dos filmes em moldes, é um processo que tem como fundamento a formação do filme sobre a área onde será administrado, por meio da aplicação de uma solução, gel ou emulsão formadora de filme. Sendo esse constituído por polímeros, formadores de filme e um veículo, que evapora de forma rápida, deixando uma película residual com os excipientes e o fármaco no lugar onde foi aplicado (Figura 4, RANADE *et al.*, 2017; KATHE & KATHPALIA, 2017).

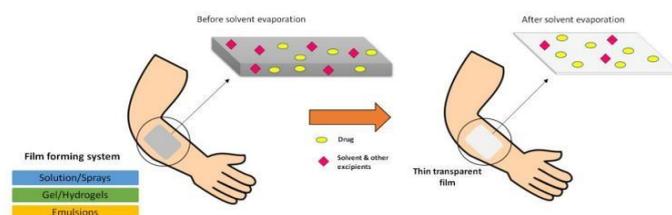


Figura 4. Modo de ação dos filmes poliméricos.

Fonte: Kathe & Kathpalia (2017).

#### 4 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C.; DA SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, jul. 2016.
- ARCANJO, A. H. M., OLIVEIRA, P. C. S., MOREIRA, L. C., JAYME, C. G., SOARES, N. A., OLIVEIRA, A. R., PEREIRA, K. A., & NOGUEIRA, M. A. R. (2017). Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology**, 10(1).
- ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, maio 2004.
- ASKARIAN, F. et al. *Staphylococcus aureus* membrane-derived vesicles promote bacterial virulence and confer protective immunity in murine infection models. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p.01-17, fev.2018.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, v. 21, n. 1, p. 36–49, jun. 2020.
- BABILAS, P.; KARRER, S.; SIDOROFF, A.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Photodynamic therapy in dermatology - An update. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 142–149, jun. 2005.
- BANNERMAN, D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal of animal science**, v. 87, n. 13 Suppl, p. 10–25, abr. 2009.
- BRITO, J.R.F.; BRITO M.P.V.P. Mastite bovina – Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. **Embrapa Gado de Leite**.p. 07-15. 2000.
- BRITTO, M.A.; BRITTO, J.R. Agronegócio do leite: Mastite. **EMBRAPA**, 2021. Disponível em:< [https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e](https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e)
- BOATENG, J. S.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M.; AUFFRET, A. D.; HUMPHREY, M. J.; MATTHEWS, K. H. Development and mechanical characterization of solvent-cast polymeric films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 8, p. 986–996, ago. 2009.
- CARRÉ, V.; GAUD, O.; SYLVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO, M.; BLAIS, J.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; GUILLOTON, M. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: Influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 48, n. 1, p. 57–62, jan. 1999.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, dez. 2004.
- CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Prog. Polym. Sci**, v.1, n.53, p.86–168, fev.2016.
- DIAS, J. A.; APARECIDA, M.; PAIVA, V.; GUILHERME, B.; DE SOUZA, N. Mastite Epidemiologia e controle. 2020. **Pecuária Leiteira na Amazônia**. Available at:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/217360/1/cpafro-18461.pdf>. Acesso em: 19 set. 2023.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v. 38, p. 2628-2635, 1978.

DÜRR, J. W. **Como produzir leite de qualidade**. 4ed. Brasília. SENAR, p.44, 2012. Acesso em: 06 set. 2023. Disponível em:< <https://www.senar-ap.org.br/uploads/biblioteca/2015/06/producao-de-leite-conforme-instrucao-normativa-n-62.pdf>>.

EDUARDO, C. P.; SILVA, M. S. B.; RAMALHO, K. M.; LEE, E. M. R.; ARANHA, A. C. C. Photodynamic therapy as a complementary benefit in the dental clinic. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentista**, v. 69, n. 3, p. 226–235, 2015.

FERRAZ, R. C. M. C.; FONTANA, C. R.; DE RIBEIRO, A. P.; TRINDADE, F. Z.; BARTOLONI, F. H.; BAADER, J. W.; LINS, E. C.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Chemiluminescence as a PDT light source for microbial control. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, n. 2, p. 87–92, maio 2011.

FONSECA, M. E. B.; MOURÃO, A. M.; CHAGAS, J. D. R.; ÁVILA, L. M.; MARQUES, T. L. P.; BAÊTA, B. A.; MORAES, R. F. F.; ROIER, E. C. R. Mastite bovina: Revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 2, p. 1–18, fev. 2021.

GALSTYAN, A.; DOBRINDT, U. Determining and unravelling origins of reduced photoinactivation efficacy of bacteria in milk. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, p. 111554, ago. 2019.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; NUNEZ, S. C.; SOUZA, F. R. Terapia fotodinâmica em odontologia laser de baixa potência para redução microbiana. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentista**, v. 57, n. 3, p. 223–226, maio 2003.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 377–382, abr. 2016.

GONÇALVES, P. J. et al. Photoinactivation of Salmonella enterica (serovar Typhimurium) by tetra-cationic porphyrins containing peripheral [Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> units. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s. l.], v. 391, n. January, p. 112375, mar. 2020.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–450, abr. 2004.

HARIRAN, M. & BOGUE, A. - DRUG DELIV. **Technol.**, 9, P.26 (2009).

HAWARI, A. D.; HASSAWI, D. S. Mastitis in One Humped She-Camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 5, p. 958–961, jun. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de leite no Brasil**. 2022. Disponível em:< <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21121-primeiros-resultadios-2leite.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 13 fev. 2023.

KATHE, K.; KATHPALIA, H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 487–497, nov. 2017.

KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and**

**Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 3–7, maio 2004.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.11, p.1261-1269, nov.2017.

LENG, Q., Li, Y., PANG, X., WANG, B., WU, Z., Lu, Y., XIONG, K., ZHAO, L., ZHOU, P., & FU, S. Curcumin nanoparticles incorporated in PVA/collagen composite films promote wound healing. **Drug delivery**, v. 27, n.1, p.1676–1685, nov. 2020.

LOPES, T. S.; FONTOURA, P. S.; OLIVEIRA, A.; RIZZO, F. A.; SILVEIRA, S.; STRECK, A. F. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 131, p. 186–193, ago. 2020.

MACHADO, A, E, H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química**, v.23, n.2, p.237-243, nov.2000.

MAIOCHI, R. R.; RODRIGUES, R. G. A.; WOSIACKI, S. R. Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.16, n. 29, p. 1237-1251, abr.2019.

MAISCH, T. A New Strategy to Destroy Antibiotic Resistant Microorganisms: Antimicrobial Photodynamic Treatment. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 974–983, jul. 2009.

MASSOTE, V. P.; ZANATELI, B. M.; ALVES, G. V.; GONÇALVES, E. S. GUEDES, E. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agro veterinária do Sul de Minas**, v. 1, n. 1, ago.2019.

MENEZES, H.M.de; MILHOMEM, T.F.; SILVA, M.A.de. Mastitis in cows: care and prevention. **Brazilian Journal of Health Review**, v.6, n.2, p.7029-7038, mar./abr., 2023.

MELO, W. C.; AVCI, P.; OLIVEIRA, M. N.; GUPTA, A.; VECCHIO, D.; SADASIVAM, M.; CHANDRAN, R.; HUANG, Y.-Y.; YIN, R.; PERUSSI, L. R.; TEGOS, G. P.; PERUSSI, J. R.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 7, p. 669–693, jul. 2013.

MUSHTAQ, S.; SHAH, A. M.; SHAH, A.; LONE, S. A.; HUSSAIN, A.; HASSAN, Q. P.; ALI, M. N. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial pathogenesis**, v. 114, p. 357–361, jan. 2018.

NAGATA, J. Y.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; BATISTELA, V. R.; TERADA, R. S. S.; GRACIANO, A. X.; BAESSO, M. L.; HAYACIBARA, M. F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122–131, jun. 2012.

NETTO, V.N.; GOMES, A.T. **Agronegócio do leite: Importância Econômica e Social**. 2021. Disponível em: < [https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/politicas/importancia-economica-e-social](https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/politicas/importancia-economica-e-social)>. Acesso em: 03 out. 2023.

OSHIRO JUNIOR, J. A.; SHIOTA, L. M.; CHIAVACCI, L. A. Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. **Matéria**, v. 19, n. 1, p. 24–32, mar. 2014.

PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J. M. Correlation of Subcellular and Intratumoral Photosensitizer Localization with Ultrastructural Features After Photodynamic

- Therapy. **Ultrastructural Pathology**, v. 20, n. 2, p. 109–129, jan. 1996.
- PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTHER, J.; YANG, W.; SEYFERT, H.-M.; NÜRNBERG, G.; SCHUBERTH, H.-J. Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. **Veterinary Research**, v. 39, n. 2, p. 18, mar. 2008.
- PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 3–8, fev. 2009.
- RANADE, S. et al. Fabrication of tropical metered dose film forming sprays for pain management. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 132-141, mar.2017.
- RODRIGUES, B. M.; SARAIVA, B. B.; SILVA JUNIOR, R. C.; CAMPANHOLI, K. S. S.; ALCALDE, C. R.; POZZA, P. C.; MADRONA, G. S.; POZZA, M. S. S. Safranin-O-Mediated Photodynamic Inactivation of Microorganisms Reduces Milk Contaminating Bacteria Count and Prevented New Cases of Mastitis. **Tropical Animal Science Journal**, v. 46, n. 1, p. 122–130, mar. 2023.
- SANKAR, P. New Therapeutic Strategies to Control and Treatment of Bovine Mastitis. **Veterinary Medicine - Open Journal**, v. 1, n. 2, p. 7–8, nov. 2016.
- SELLERA, F. P.; SABINO, C. P.; RIBEIRO, M. S.; GARGANO, R. G.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; POGLIANI, F. C. *In vitro* photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 276–281, mar. 2015.
- SILVA JUNIOR, R. C.; CAMPANHOLI, K. S. S.; MORAIS, F. A. P.; POZZA, M. S. S.; CASTRO-HOSHINO, L. V.; BAESSO, M. L. S. J. B.; BRUSCHI, M. L.; CAETANO, W. Photothermal Stimuli-Responsive Hydrogel Containing Safranin for Mastitis Treatment in Veterinary Using Phototherapy. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 1, p. 581–596, 18 jan. 2020. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01143>.
- SILVA JUNIOR, R. C.; SILVA, S. C. K.; MORAIS, F. A. P.; SOARES, S. P.; SANTOS, G. M. T.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Development and applications of safranin-loaded Pluronic® F127 and P123 photoactive nanocarriers for prevention of bovine mastitis: In vitro and in vivo studies. **Dyes and Pigments**, v. 167, p. 204–215, ago. 2019.
- SIQUEIRA, B, O. Potencial fotossensibilizante de extratos de plantas do agreste na técnica de terapia fotodinâmica. **Faculdade de Odontologia de Lins/Unimep** • 28(2) 27-38 • jul.-dez. 2018 ISSN Impresso: 0104-7582 • ISSN Eletrônico: 2238-1236.
- SUKSAEREE, J.; MANEEWATTANAPINYO, P.; PANRAT, K.; PICHAYAKORN, W.; MONTON, C. Solvent-Cast Polymeric Films from Pectin and Eudragit® NE 30D for Transdermal Drug Delivery Systems. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, n. 10, p. 3174–3184, out. 2021.
- VILLANOVA, J. C. O. & Sá, V. R. - “Excipientes: guia prático para padronização”, **Pharmabooks**, São Paulo (2009).
- WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; MARLAND, J.; WAREING, D. R. A.; BOLTON, F. J. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75–80, set. 1997.
- WEIS, G.C.C. et al. **Boas práticas na produção de leite**. Santa Maria, RS: UFSM, Pró-Reitoria de Extensão,2022. *Ebook*. Disponível em:<

[https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/28414/Boas\\_Pr%c3%a1ticas\\_Agropecu%c3%a1rias\\_na\\_Produ%c3%a7%c3%a3o\\_de\\_Leite.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/28414/Boas_Pr%c3%a1ticas_Agropecu%c3%a1rias_na_Produ%c3%a7%c3%a3o_de_Leite.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 13 fev.2024.

WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 9, p. R61, abr. 2008.

**CAPÍTULO 2. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR MEIO DO USO DE FILMES POLIMÉRICOS ASSOCIADOS OU NÃO COM SAFRANINA**

### **Inativação fotodinâmica *in vitro* de *Staphylococcus aureus* por meio do uso de filmes poliméricos associados ou não com safranina**

Gabriela Iantorno de Souza<sup>\*1</sup>, Janaina Cecília Oliveira Villanova<sup>2</sup>, Juliana Alves Resende<sup>2</sup>, Geanne Aparecida de Paula<sup>3</sup>, Allison Queiroz de Oliveira<sup>4</sup>, Marco Túlio Costa Almeida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Departamento de Zootecnia, Campus Cinobelina Elvas, Ininga - s/n, Ininga - 64049-550 – Teresina, PI – Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Zootecnia, Campus Alegre, Alto Universitário - s/nº, Guararema - 29500-000 – Alegre, ES – Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Farmácia, Campus Araraquara, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1 - 14801-902 – Araraquara, SP – Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Estatística, Avenida Pádua Dias-nº11-13418-900 – Piracicaba, SP-Brasil.

\*Autor para correspondência: <gabriela.i.souza@ufpi.br>

**Resumo:** A mastite é definida como inflamação da glândula mamária, causada principalmente por *Staphylococcus aureus*. Como alternativa de prevenção surge a Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFMO). Sendo assim, esse estudo avaliou o uso de filmes poliméricos associado ou não ao corante safranina na IFMO em cepas de *Staphylococcus aureus*. Foram preparadas quatro formulações sob dois ensaios, o primeiro com as formulações 1 composta de poli(álcool vinílico) (PVA), poliacrilato de sódio e safranina e 2 contendo PVA e poliacrilato de sódio e o segundo ensaio com as formulações 3 elaborada de PVA e safranina e 4 somente PVA. Foi realizada a atividade antimicrobiana sob duas diluições ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e tempos de exposição à luz (0, 1 e 5 minutos), sendo doze repetições por formulação. O delineamento foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x3x2) por meio da técnica de modelos generalizados e teste de Tukey 5%. A formulação 1 teve inibição total no crescimento microbiano sem ou com a presença da luz, sendo diferente no tempo de 1 minuto nas diluições 1 ( $10^{-2}$ ) e 2 ( $10^{-3}$ ). Quanto à formulação 2, em todos os níveis de exposição à luz (sem luz, 1 minuto e 5 minutos), houve crescimento microbiano, porém no menor tempo foi observado redução da carga bacteriana na diluição 2. Na formulação 3, não foi observado crescimento microbiano tanto na ausência quanto na presença de luz e independente da diluição, porém na formulação 4 houve crescimento bacteriano nos três tempos de exposição, tendo uma redução da contagem de microrganismos no tempo de 1 minuto. As formulações contendo safranina e sem presença de luz reduziram a carga de *Staphylococcus aureus*, sendo uma alternativa para a

prevenção da mastite e filmes sem safranina e com exposição à luz no tempo de 1 minuto, diminuíram a carga bacteriana.

**Palavras-chave:** Formulação. Microrganismos. Polímeros. Terapia Fotodinâmica.

## **Introdução**

A mastite bovina é uma doença de alta prevalência, principalmente para animais destinados à produção leiteira. De diversas origens e ocorrência mundial, sendo a principal causa associada com o manejo sanitário dos animais e da ordenha. Desse modo, vem sendo investigadas possibilidade para prevenção (Langoni *et al.*, 2017).

Além das medidas higiênico-sanitárias usadas rotineiramente, como higienização e limpeza das instalações, dos materiais de ordenha, das mãos do ordenhador, dos tetos e realização de *pré-dipping* e *pós-dipping*, outro fator de suma importância é em relação aos patógenos que habitam o interior da glândula mamária, pois dificultam o processo de combate aos agentes patogênicos. Por esse motivo, há uma demanda por estratégias tecnológicas para o tratamento da mastite (Gomes; Henriques, 2015; Sankar, 2016).

Surge então, a Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFMO), que tem como princípio a combinação de uma substância fotossensibilizadora e luz de comprimento de onda específico, que quando ativada produz espécies reativas de oxigênio (EROs), que ocasionam na morte celular (Silva Junior *et al.*, 2019). Outra possibilidade que pode ser usada na prevenção da mastite, é o uso de filmes poliméricos, que tem inúmeras aplicabilidades na área farmacêutica para produção de diversos medicamentos, no entanto nos últimos anos tem sido usada na medicina veterinária para prevenção de doenças, como a mastite, tendo como objetivo agilizar o processo de cicatrização, além de apresentarem baixo grau de toxicidade, rápida evaporação, serem de fácil aplicação, eliminação e baixo custo (Chen; Liu, 2016; Oshiro Junior; Shiota; Chiavacci, 2014).

No entanto, são inéditos estudos relacionados com a utilização de filmes de poli (álcool vinílico) (PVA) e poliacrilato de sódio associado com a safranina aliado a Inativação Fotodinâmica de Microrganismos voltados para a prevenção da mastite em animais ruminantes, sendo assim, hipotetiza-se que as formulações contendo safranina sejam eficazes com o uso da luz. Desse modo, objetivou-se avaliar o uso de filmes poliméricos associados ao corante safranina na IFMO *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus*.

## **Material e métodos**

## Local do experimento e delineamento experimental

O experimento foi realizado nos laboratórios de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos e de Análises Clínicas, ambos pertencentes a Universidade Federal do Espírito Santo, campus Alegre, localizado no município de Alegre, Espírito Santo.

Foram preparadas quatro formulações sob dois ensaios, o primeiro com as formulações 1 composta de poli(álcool vinílico) (PVA), poliacrilato de sódio e safranina e 2 contendo PVA e poliacrilato de sódio e o segundo ensaio com as formulações 3 elaborada de PVA e safranina e 4 somente PVA. E a partir das formulações realizada atividade antimicrobiana sob duas diluições ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e com tempos de exposição à luz (0, 1 e 5 minutos), totalizando doze repetições por formulação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial ( $2 \times 3 \times 2$ ) por ensaio, onde os fatores são as formulações, diluições e tempos de exposição.

## Blendas poliméricas

Os filmes foram preparados no Laboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Alegre. Para a produção, como excipientes foram usados o poli(álcool vinílico) (PVA), poliacrilato de sódio, etilenodiamino tetra-acético (EDTA), propilenoglicol (PPG), sorbato de potássio, álcool etílico de cereais e a safranina.

As composições qualitativa e quantitativa das blendas são dadas na Tabela 4 e foram definidas a partir de modificações na formulação proposta por Nishikawa *et al.* (2007). Foram preparadas quatro formulações com ou sem adição de safranina. Os componentes das formulações foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g.

Tabela 4. Composição qualitativa e quantitativa das formulações selecionadas com safranina a 0,84% p/p.

Composição	Quantidade (% p/p)			
	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Formulação 4
PVA	20,0	20,0	20,0	20,0
Poliacrilato de sódio	0,75	0,75	-	-
EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1
PPG	6,0	6,0	6,0	6,0
Sorbato de potássio	0,15	0,15	0,15	0,15
Álcool de cereais	10,0	10,0	10	10
Água purificada	100,0	100,0	100,0	100,0
QSP				
Safranina	0,84	-	0,84	-

O PVA foi completamente solubilizado em parte da água, por meio do agitador magnético sob aquecimento de 65° a 75° C. Os demais polímeros foram adicionados a forma sólida, mantendo-se sob agitação até completa dispersão e homogeneização. Em seguida, foram adicionados os conservantes (EDTA e sorbato de potássio) solubilizados em quantidade suficiente de água, mantendo-se a agitação sem aquecimento. O álcool de cereais foi adicionado após arrefecimento da blenda e, por fim, o agente plastificante PPG incorporado sob agitação constante. A safranina foi incorporada diretamente, mediante agitação magnética, sem aquecimento, na proporção de 0,84% p/p.

Após preparo, as blendas foram avaliadas macroscopicamente, para descrição, sendo analisados os parâmetros: cor, transparência, homogeneidade, presença de bolhas e de sólidos insolúveis. A viscosidade foi avaliada por meio de viscosímetro rotacional digital BROOKFIELD (modelo LV-DV2T, USA) utilizando adaptador de pequenas amostras, empregando *spindle* S4-31 (determinado experimentalmente), na velocidade de 25 rpm, com torque variando entre 20 e 90 %. Também foram avaliadas as características organolépticas dos filmes formados, como maciez, flexibilidade, presença de precipitado e resistência ao manuseio na presença da safranina a 0,84% p/p. A fim de analisar a capacidade de cobertura e parâmetros de qualidade físico-químicos dos filmes formados, as formulações foram espalhadas sobre placas de vidro utilizando acessório adaptado, com controle de espessura de 0,75 mm. Finalizada a aplicação das blendas contendo a safranina 0,84%, as placas foram deixadas expostas ao ar para secagem, e os filmes cortados em dimensões de 2 x 2 cm (Figura 5).

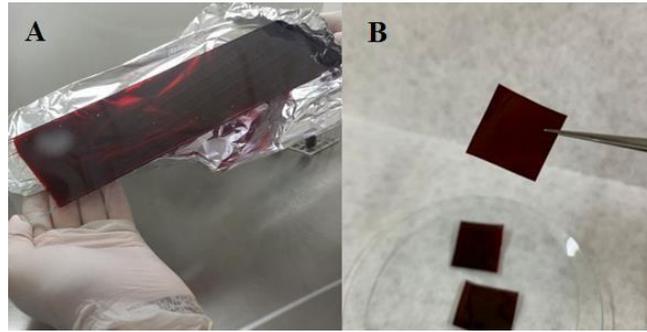


Figura 5. Blenda polimérica contendo safranina sob placa de vidro (A) e filme com Safranina 0,84% cortado (B).

Fonte: próprio autor

#### Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes sobre *Staphylococcus aureus*

O protocolo para as análises microbiológicas foi de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2022). Os meios de cultura utilizados foram o Brain Heart Infusion (BHI) e o ágar nutriente. Inicialmente, foi realizado o cultivo da linhagem controle *S. aureus* (ATCC 25923) em meio BHI à  $35 \pm 2^\circ \text{C}$ , por 24 horas. A cultura foi submetida à coloração de Gram para confirmar a pureza da espécie. Após o crescimento bacteriano, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez óptica comparável à da solução padrão de 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida 100  $\mu\text{L}$  da cultura ajustada para 0,5 da escala de McFarland foram inoculados em 9900  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril (NaCl 0,9%), obtendo  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. Desta suspensão 300  $\mu\text{L}$  foram inoculados em 29700  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton, obtendo assim  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL (Figura 6).

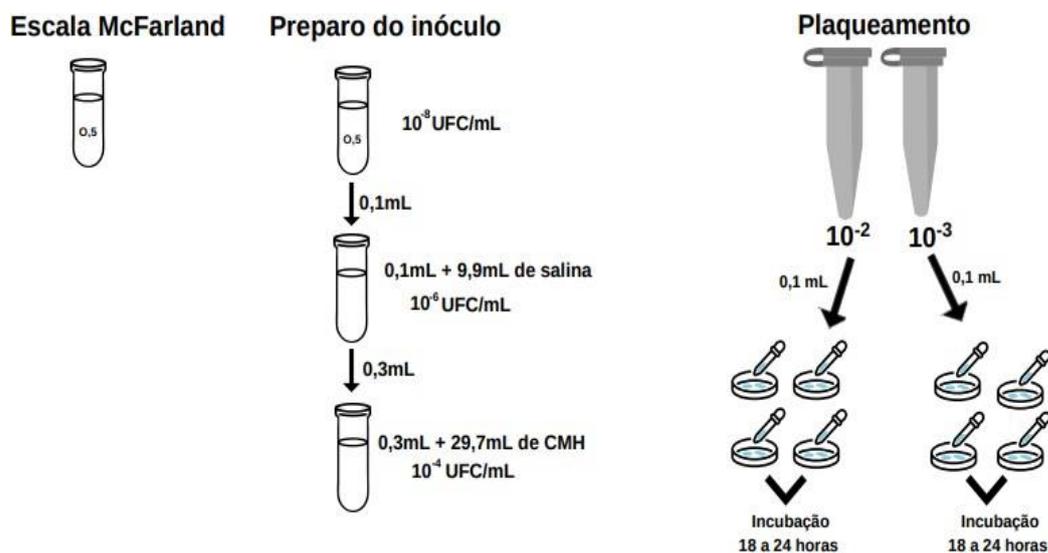


Figura 6. Preparo do inóculo na escala McFarland.

Fonte: próprio autor

Em tubos de vidro com tampa de rosca estéreis, foram pesados assepticamente 0,3g de cada formulação a ser testada e adicionados 3 mL da cultura de microrganismos ajustada para  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL. Para facilitar a homogeneização, utilizou-se o vórtex. Após o preparo do meio, os tubos foram irradiados com a luz LED verde 5 mm ( $\lambda = 520$  nm) acoplada a um frasco aplicador *pós-dipping*, com potência ótica de 64 mW, sob os tempos 1 e 5 minutos de irradiação (Figura 7), levando a uma dose de energia de  $19,2 \text{ J/cm}^2$ .

Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica por 24h a  $35,5^\circ\text{C}$ . Também foi preparado um controle de crescimento sem e com presença de luz e confirmada a pureza da cultura, 3 mL da cultura de microrganismos ajustada e 1 mL de solução salina estéril. Ao fim, a densidade populacional bacteriana em cada tubo de ensaio, foi de aproximadamente  $2,0 \times 10^4$  UFC/mL.

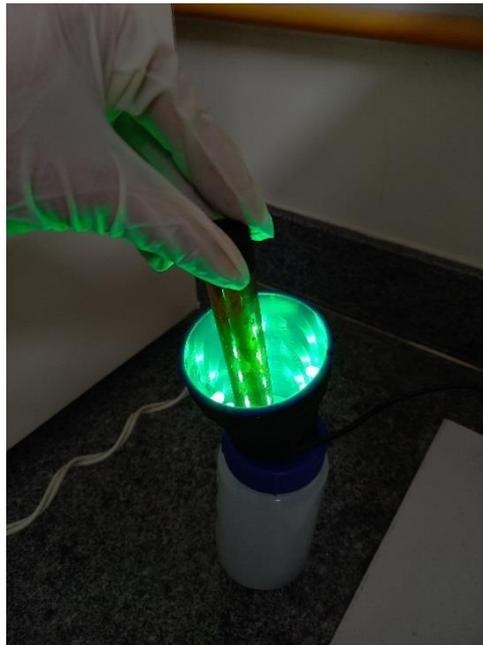


Figura 7. Tubo de ensaio contendo inóculo sob irradiação.

Fonte: próprio autor

Após o período de incubação, foram preparadas diluições seriadas ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em caldo caseína a partir dos tubos testes, do controle de crescimento e do controle positivo. Adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  de cada diluição que foram inoculados na superfície de placas de ágar nutriente em duplicata e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski, para contagem do número de microrganismos viáveis.

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  por 72 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de UFC/ placa. Os limites máximos e mínimos para contagem de microrganismos viáveis foram estabelecidos com base em regras gerais de contagem de microrganismos viáveis sendo contadas placas que possuíam de 25 – 250 UFC segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2000). As placas com número de colônias superiores a 250 UFC tiveram o resultado registrado como incontáveis. Todas as etapas estão resumidas na figura 8. A densidade populacional foi contabilizada conforme fórmula a seguir:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{número de UFC} \times \text{fator de diluição}}{\text{aliquota de plaqueamento}}$$

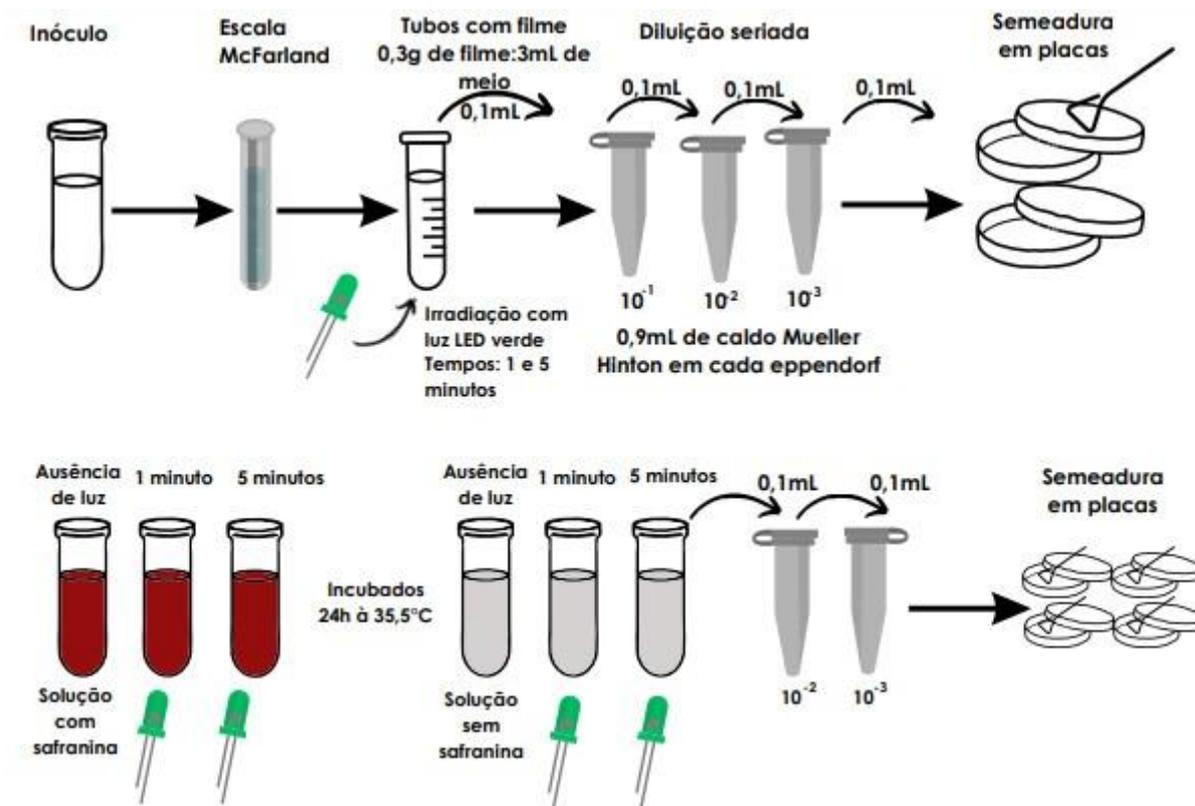


Figura 8. Protocolo do experimento.

Fonte: próprio autor

### Análise Estatística

Para análise dos dados obtidos *in vitro* foi adotado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial ( $2 \times 3 \times 2$ ) por meio da técnica de modelos generalizados lineares, considerando a distribuição binomial negativa com função de ligação raiz quadrada e para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey com significância de 5%, usando o software R versão 4.3.1.

## Resultados e discussão

Observou-se que as médias das formulações 1 e 2 foram diferentes entre os tempos de irradiações (Tabela 5). A formulação 1 teve inibição total no crescimento microbiano sem ou com a presença da luz, sendo significativo somente no tempo de 1 minuto na diluição 1 ( $10^{-2}$ ). Para a formulação 2, sem ou com a presença de luz, houve maior crescimento microbiano na diluição 1 ( $10^{-2}$ ), porém na diluição 2 ( $10^{-3}$ ) foi verificado redução da carga bacteriana no menor de tempo de exposição à luz (Figura 9).

Tabela 5. Média e desvio padrão das formulações 1 e 2.

Formulação	Tempo de exposição à luz	Diluição				<i>p</i> -valor
		$10^{-2}$		$10^{-3}$		
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão	
1	Sem luz	0.000	0.000	0.000	0.000	>0,05
	1 minuto	1.000	1.154	0.000	0.000	
	5 minutos	0.000	0.000	0.000	0.000	
2	Sem luz	180	8.082	24.50	6.350	<0,05
	1 minuto	1.500	1.732	0.000	0.000	
	5 minutos	315	17.320	42.50	5.196	

Os dados são expressos como média do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias). 1 – PVA + Poliacrilato de sódio + Safranina 0,84% e 2 - PVA + Poliacrilato de sódio.

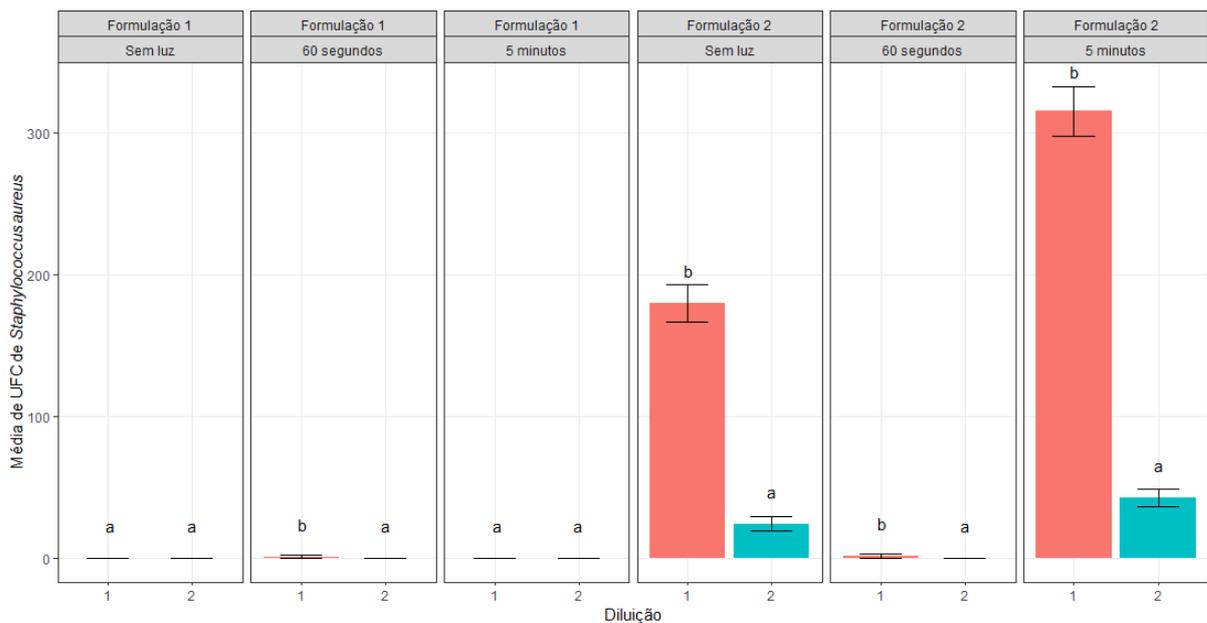


Figura 9. Intervalo de confiança e comparação pelo teste de Tukey das médias de contagem de UFC's entre os níveis de diluições em relação à cada combinação de formulação e tempo de exposição à luz.

A formulação 2 foi menos eficiente no controle bacteriano, quando comparada com a formulação 1, dado os maiores valores de médias (Tabela 5). Esses resultados confirmam que a incorporação da safranina no filme proporciona atividade antimicrobiana, podendo ser tão eficiente quanto as soluções comumente usadas como *pós-dipping*.

A inibição total do crescimento microbiano na formulação 1 contendo os polímeros PVA e poliacrilato de sódio em associação com a safranina 0,84% na ausência de luz, mostrou-se 100% eficaz no controle da cepa avaliada de *Staphylococcus aureus* (Figura 9). De acordo com Costa *et al.* (2020), blendas desenvolvidas a partir desses dois polímeros, proporciona atividade antimicrobiana de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Já Silva Junior *et al.* (2020), avaliaram o efeito da inativação fotodinâmica de microrganismos causadores da mastite, a partir do hidrogel de safranina, sendo essa formulação composta por polímeros de Pluronic (F127). Ainda que, distinta as formulações e o excipiente incorporado, justifica a inibição do crescimento microbiano da cepa avaliada e que em ambas as pesquisas, os resultados foram semelhantes.

Em relação à redução dos microrganismos na formulação 2 composta por PVA e poliacrilato de sódio quando irradiadas com a luz LED verde no tempo de 1 minuto, não foram encontrados relatos na literatura da associação desses dois polímeros com presença de luz. Esse resultado pode ser explicado em função do conceito de inativação fotodinâmica, os polímeros podem ter sido ativados com a presença da luz e terem produzido espécies reativas de oxigênio, que ocasionou na morte celular da cepa avaliada. As moléculas dos polímeros são formadas por hidrocarbonetos, ou seja, possuem átomos de carbono e hidrogênio, quando irradiados com o LED verde, pode ter ocorrido a transferência de elétrons entre a estrutura dos polímeros e a luz, gerando o oxigênio singleto, uma das formas de espécies reativas de oxigênio (EROS), que compromete a estrutura da célula e conseqüente na morte celular (Melo, 2013; Wilson; Patterson, 2008).

Aumento da carga microbiana da formulação 2 na irradiação por 5 minutos também foi observada, contudo, não foram encontrados relatos que possam subsidiar os resultados obtidos, mas supõe-se que esteja relacionado com a intensidade luminosa do sistema utilizado no presente estudo para irradiação em função do tempo. De acordo com Ferraz *et al.* (2011), a diminuição da intensidade luminosa diminui em função do tempo, de modo que, afeta o efeito fotodinâmico, pois modifica a energia entregue. Ainda que, diferente o fotossensibilizador, este

pensamento pode ser utilizado, uma vez que a diminuição da carga bacteriana em ambos foi semelhante.

Quanto à formulação 3 inibiu totalmente o crescimento de *S. aureus* tanto na ausência quanto na presença da luz LED verde ( $\lambda = 520$  nm), diferentemente para a formulação 4 que teve crescimento da cepa em todos os tempos de irradiações e diluições (Tabela 6; Figura 10). Pode-se afirmar que o PVA sem adição da safranina, torna-se ineficaz para o controle da cepa avaliada, é necessário a associação desse polímero com um excipiente que tenha atividade antimicrobiana. Apesar de não terem sido observados relatos dessa associação na literatura, de acordo com Rodrigues *et al.* (2023), a combinação do polímero Pluronic (F127) com safranina (300  $\mu\text{g/mL}$ ) reduz a carga bacteriana de *S.aureus* por meio da inativação fotodinâmica com o uso da luz LED verde ( $\lambda=520$  nm), mesmo a formulação proposta não ter a mesma composição e inativado na ausência de luz, pode-se evidenciar semelhança do que ocorreu nesta pesquisa, validando a eficácia da safranina quando combinada com polímeros.

Tabela 6. Média e desvio padrão das formulações 3 e 4.

Formulação	Tempo de exposição à luz	Diluição				<i>p</i> -valor
		10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-3</sup>		
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão	
3	Sem luz	0.000	0.000	0.000	0.000	>0,05
	1 minuto	0.000	0.000	0.000	0.000	
	5 minutos	0.000	0.000	0.000	0.000	
4	Sem luz	360	0.000	69	4.619	<0,05
	1 minuto	157	6.928	11.500	12.124	
	5 minutos	171	5.774	33	1.155	

Os dados são expressos como média do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias). 3 – PVA+Safranina 0,84% e 4 - PVA.

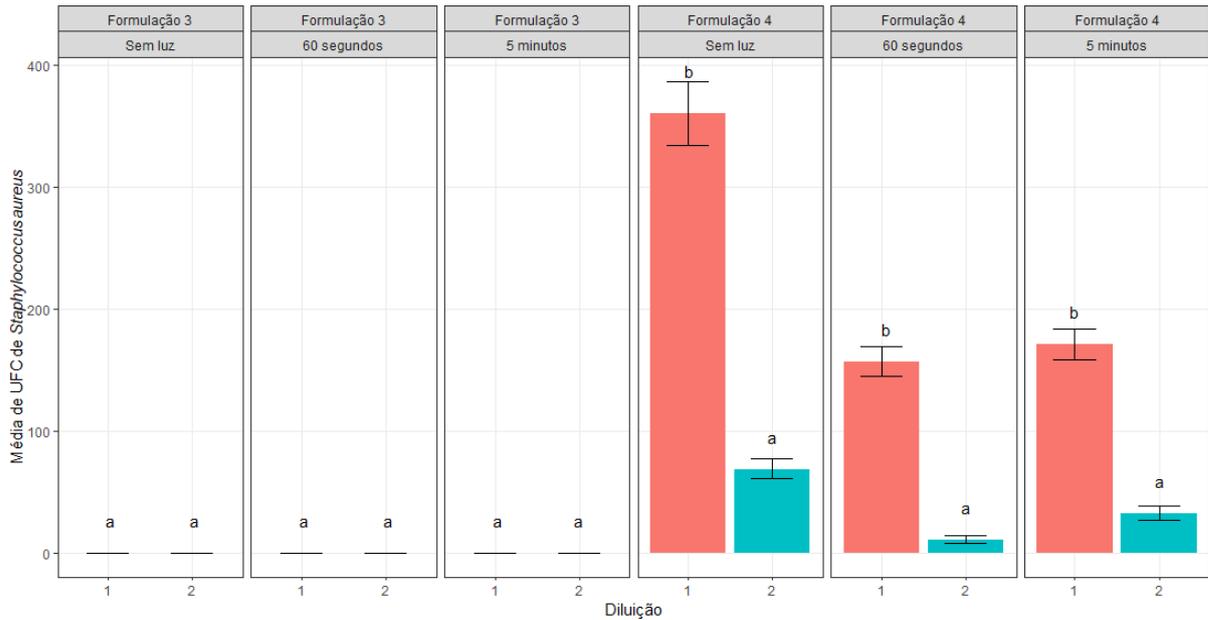


Figura 10. Intervalo de confiança e comparação pelo teste de Tukey das médias de contagem de UFC's entre os níveis de diluição em relação a cada combinação de formulação e tempo de exposição à luz.

Para a formulação 4, contendo apenas o PVA, pode-se notar que teve crescimento microbiano em todos os tempos de exposição, com isso, podemos afirmar que a safranina tem efeito antimicrobiano corroborando com o estudo de Rodrigues *et al.* (2023). Observa-se também que na diluição 2 ( $10^{-3}$ ) apresentou menor desenvolvimento bacteriano em relação aos tempos, ao mesmo passo que aparentemente a maior contagem de UFC's se encontra na combinação em que não há exposição à luz (Figura 10).

Leng *et al.* (2020) utilizou o filme de PVA combinado com colágeno e curcumina em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* no processo de cicatrização de feridas, sendo eficaz em ambos os microrganismos. Pode-se verificar que o PVA tem ação antimicrobiana somente quando incorporado com outros excipientes. O PVA é um polímero que possui afinidade pela água e biocompatível, o que permite sua combinação com uma variedade de substâncias, sejam elas de origem natural ou sintética, sem que o polímero se degrade, assegurando a eficácia do produto.

A atividade antimicrobiana da safranina na ausência de luz, foi um resultado inesperado. A safranina é um corante sintético da classe das fenazinas, que tem como característica capacidade de interagir com substratos biológicos, alta absorvidade, fototoxicidade pronunciada e oxidação mitocondrial. Com isso, bactérias gram-positivas, como é o caso de *S. aureus*, capturam facilmente o corante, devido a composição parede celular, que são mais permeáveis

quando comparadas com bactérias gram-negativas (Perussi, 2007). Além disso, possuem em sua estrutura celular uma enzima chamada de catalase, que tem como finalidade decompor o peróxido de hidrogênio (substância altamente tóxica para o microrganismo), que é formado a partir da oxidação do metabolismo aeróbico de carboidratos, sendo um importante sinalizador intracelular.

Pode-se supor que a safranina quando em contato com a membrana interna do microrganismo, atuou como um antagonista na atividade da catalase, com isso, intensificando a produção do peróxido de hidrogênio que quando em altas concentrações é letal para o microrganismo, induzindo a morte celular. Beech *et al.* (2015), avaliaram o efeito do cristal violeta, azul de metileno e safranina com o uso da luz branca para redução de carga bacteriana de *S. aureus* e *Escherichia coli* e a fotossensibilização foi letal para ambos. Mesmo que, a inativação ocorreu mediante exposição à luz, esses resultados assemelham-se em relação a sensibilidade que bactérias Gram-positivas tem com o corante safranina e essa induzindo a morte celular, justificando os resultados obtidos.

## **Conclusões**

Filmes poliméricos, quando associados com a safranina e sem presença de luz, inibem totalmente a contagem de *S. aureus*, consistindo em alternativa inovadora para prevenção da mastite.

Blendas poliméricas sem a incorporação da safranina e com exposição à luz no tempo de 1 minuto, reduz a carga de *S. aureus*.

## **Contribuição dos autores**

**Conceitualização:** Souza GI, Almeida MTC, Villanova JC, Resende JA. **Análise formal:** Queiroz AO. **Investigação:** Souza GI, Almeida MTC. **Metodologia:** Villanova JC, Resende JA, Paula GA.

## Referências

- Beech SJ; Noimark S; Page K; Noor N; Allan E; Parkin IP. 2015. RSC Advances 5: 26364 – 26375. DOI: 10.1039/c5ra01673h.
- Chen, FM; Liu, X. 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. Prog. Polym. Sci 1: 86–168. 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.
- Costa, NN et al. 2020. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis and physicochemical evaluation. Materials Science and Engineering C Mater Biol Appl 109:110643. 10.1016/j.msec.2020.110643.
- Ferraz, RCMC; Fontana CR; de ribeiro AP; Trindade FZ; Bartoloni FH; Baader JW; Lins EC; Bagnato VS; Kurachi C. 2011. Chemiluminescence as a PDT light source for microbial control. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 103:87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.01.018>.
- Galstyan A; Dobrindt U. 2019. Determining and unravelling origins of reduced photoinactivation efficacy of bacteria in milk. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 197:111554. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111554>.
- Gomes F; Henriques M. 2016. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. Current Microbiology 72:377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>.
- Langoni H. et al. 2017. Considerações sobre o tratamento das mastites. Pesquisa Veterinária Brasileira 37:1261-1269. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100011>.
- Leng Q; Li Y; Pang X; Wang B; Wu Z; Lu Y; Xiong K; Zhao L; Zhou P; Fu, S. 2020. Curcumin nanoparticles incorporated in PVA/collagen composite films promote wound healing. Drug delivery 27:1676–1685. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1853280>.
- Melo WC; Avci P; Oliveira MN; Gupta A; Vecchio D; Sadasivam M; Chandran R; Huang YY; Yin R; Perussi LR; Tegos GP; Perussi JR; Dai T; Hamblin MR. 2013. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. Expert Review of Anti-infective Therapy 11:669–693. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.811861>.
- Nishikawa DO; Zague V; Pinto CASO; Vieira RP; Kaneko TM; Velasco MVR; Baby AR. 2007. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-off contendo rutina. Rev. de Ciênc. Farm. Básica e Apl 28: 227- 233. ISSN 1808-4532.
- Oshiro Junior JA; Shiota LM; Chiavacci LA. 2014. Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. Matéria 19:24–32. <https://doi.org/10.1590/S1517-70762014000100005>.
- Perussi JR. 2007. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. Química Nova 30:988-994. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>.
- Rodrigues BM; Saraiva BB; Silva Junior RC; Campanholi KSS; Alcalde CR; Pozza PC; Madrona GS; Pozza MSS. 2023. Safranin-O-Mediated Photodynamic Inactivation of Microorganisms Reduces Milk Contaminating Bacteria Count and Prevented New Cases of Mastitis. Tropical Animal Science Journal 46:122–130. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.1.122>.
- Sankar P. New Therapeutic Strategies to Control and Treatment of Bovine Mastitis. 2016.

Veterinary Medicine - Open Journal 1:7–8. <https://doi.org/10.17140/VMOJ-1-e004>.

Silva Junior RC; Campanholi KSS; Morais FAP; Pozza MSS; Castro-Hoshino LV; Baesso M LSJB; Bruschi ML; Caetano W. 2020. Photothermal Stimuli-Responsive Hydrogel Containing Safranin for Mastitis Treatment in Veterinary Using Phototherapy. *ACS Applied Bio Materials* 4:581–596. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01143>.

Silva Junior RC; Silva SCK; Morais FAP; Soares SP; Santos GMT; Hioka N; Caetano W. 2019. Development and applications of safranin-loaded Pluronic® F127 and P123 photoactive nanocarriers for prevention of bovine mastitis: In vitro and in vivo studies. *Dyes and Pigments* 167:204–215. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.04.037>.

Wilson BC; Patterson MS. 2008. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology* 53:R61. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>.