

O USO DA SAFRANINA-O COMO PÓS-DIPPING NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRORGANISMOS

Gislaine Gonçalves Oliveira (PIBIC/CNPq/UEM), Ranulfo Combuca da Silva Junior (PQU/UEM), Wellington de Oliveira Pereira (DZO/UEM), Wilker Caetano (PQU/UEM), Magali Soares Pozza (Orientador), e-mail: pozzamagali@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias / DZO -
Departamento de Zootecnia / PQU - Programa de Pós Graduação em Química -
Maringá, PR.

Área e subárea : 50400002, 50405020.

Palavras-chave: Mastite, Fotossensibilizador, IFDMO.

Resumo:

O pós-dipping é um procedimento de higienização dos tetos realizado pós ordenha que evita a proliferação de microrganismos. Esta prática mantém a qualidade do leite produzido, além de prevenir a manifestação de quadros de mastite subclínica e/ou clínica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do corante Safranina-O (Sf) como fotossensibilizador via aplicações pós-dipping em bovinos leiteiros. Avaliou-se a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, a composição físico-química e a contagem de células somáticas do leite produzido. O experimento foi conduzido em delineamento crossover (2 x 2) utilizando-se oito animais da raça holandesa com produção média diária de 25 litros, tendo iodo como controle. Para a contagem de aeróbios mesófilos não houve diferença significativa entre os tratamentos. O método de inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDMO) mostrou-se eficiente para diminuição da contagem de células somáticas e manteve a qualidade microbiológica do leite produzido. Portanto, verificou-se a viabilidade da técnica de IFDMO para esta finalidade em substituição ao iodo que é utilizado com maior frequência em propriedades.

Introdução

A produção de leite demanda condições de manejo, alimentação, ordenha e qualidade do plantel. A limpeza dos tetos, das teteiras, dos tanques de resfriamento e das mãos dos ordenhadores são ações que podem restringir ou não a presença de contaminantes no leite. Dentre os problemas que podem influenciar na qualidade do leite produzido está a mastite bovina, doença inflamatória e infecciosa causada por microrganismos tais como fungos, vírus, bactérias e algas presentes nas glândulas mamárias. Quanto à manifestação, a mastite ocorre de duas formas: clínica e subclínica. A mastite clínica geralmente é acarretada por bactérias provenientes de um contágio ambiental, onde os animais apresentam sinais claros da doença, tais como edema, hiperemia, dor, aumento da temperatura da glândula mamária, mudança na composição físico-química e presença de grumos e/ou fios de sangue no leite. Os problemas causados pela mastite subclínica não podem ser observados

na mama nem no leite, mas a constituição deste é alterada diminuindo a lactose, os sólidos totais, a gordura e a caseína (SELLERA, 2016).

Neste contexto, a IFDMO é uma modalidade terapêutica promissora no combate de doenças causadas por infecções bacterianas, fúngicas ou virais como a mastite bovina (DA SILVA JUNIOR, 2019). A IFDMO é baseada interação de um fotossensibilizador (FS), luz visível em comprimento de onda favorável e oxigênio molecular para que ocorram fenômenos fotofísicos que levam à produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e principalmente oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (CAMPANHOLI, 2018). A Sf, corante sintético da classe fenazina, é um FS com características favoráveis e tem recebido considerável atenção em aplicações IFDMO (DA SILVA JUNIOR, 2019). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso da Sf como pós dipping visando a fotoinativação de patógenos causadores de mastite bovina, e melhoria da qualidade do leite produzido.

Materiais e métodos

A Safranina-O [Cloreto de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenilfenazina] (Sf) 85% MM = $350,84 \text{ g.mol}^{-1}$ foi adquirida da Sigma-Aldrich. Como fonte de luz foi utilizado um dispositivo “home made” construído a partir de uma teteira de plástico convencional adaptada com fonte de LED verde ($\lambda = 520 \text{ nm}$) e potência de irradiação de $7,2 \text{ mW.cm}^{-2}$. O experimento foi realizado no setor de bovinocultura leiteira da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM). O delineamento experimental foi conduzido em crossover (2×2) tendo iodo $6,02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ como controle. A solução de Sf $0,85 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi aplicada nos tetos dos animais da raça Holandesa após a ordenha e irradiados com a fonte de LED por 30 (trinta) segundos. As coletas foram feitas com 7, 14, 21 e 28 dias de experimento. Para coleta das amostras, os tetos foram lavados com água e friccionou-se suabe (3M QuickSwabs) na pele do teto em uma área de 3 cm^2 . Utilizou-se um suabe para os quatro tetos de cada animal formando uma amostra composta e estes foram imersos em tubos contendo 9 mL de água peptonada estéril. Desprezou-se os três primeiros jatos de leite e ordenhado os tetos ejetando-se 10 mL em um tubo de ensaio estéril, previamente identificado. Para as amostras de suabe e leite foram avaliadas quanto à presença de aeróbios mesófilos utilizando-se ágar PCA - Plate Count Agar - sendo todas amostras incubadas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas (DA SILVA JUNIOR, 2019). Ao final de cada ordenha, amostras de leite composta de cada animal foram coletadas para realização de análises de Contagem de Células Somáticas (CCS) e composição físico-química utilizando-se os equipamentos Ekomilk Total e Ekomilk Scan. Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA). A diferença significativa entre as médias ($P < 0,05$) foi determinada por meio do teste de Tukey utilizando o software SAS 9.3 (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC).

Resultados e Discussão

Os valores médios das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos ($\log.\text{mL}^{-1}$) nas amostras de suabe (parte externa do teto) e das amostras de leite estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios das contagens de aeróbios mesófilos ($\log.mL^{-1}$) nos tetos e do leite dos animais que receberam tratamento com iodo e Sf

	Tratamento – Pós-dipping			
	Iodo $6,02 \mu mol.L^{-1}$	Sf $0,85 \mu mol.L^{-1}$	EPM	P
Suabes	3,79	4,07	0,330	0,4995
Leite	2,12	2,68	0,653	0,4736

EPM: Erro padrão médio

Médias avaliadas nas linhas para teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para as amostras obtidas de suabe e leite não houve diferença significativa na contagem de aeróbios mesófilos quando se comparou a aplicação de Sf e o controle (iodo). A utilização da Sf em baixa concentração foi eficiente comparando-se ao iodo, que é um tratamento convencional em diversas propriedades. A contagem maior de microrganismos no suabe em relação ao leite deve-se à adesão dos microrganismos à superfície do teto dificultando a ação do desinfetante. Com relação a composição do leite, os teores de gordura e proteína foram superiores aos padrões mínimos e os teores de extrato seco desengordurado (ESD) estavam inferiores a legislação vigente (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios da composição percentual do leite

	Tratamento - Pós-dipping			
	Iodo $6,02 \mu mol.L^{-1}$	Sf $0,85 \mu mol.L^{-1}$	EPM	P
Gordura	4,10	3,31	0,439	0,1611
ESD	8,28	8,17	0,089	0,3716
Densidade	1,029	1,029	0,352	0,9931
Proteína	3,47	3,42	0,035	0,3317
Lactose	4,21	4,15	0,048	0,4197
PC	-0,60	-0,59	0,0039	0,5056
pH	6,91	6,83	0,096	0,5071
Acidez ($^{\circ}D$)	22,0	22,1	0,100	0,9214
CCS	459,38	260,40	119,86	0,2511

ESD: Extrato Seco Desengordurado; PC: Ponto Crítico; CCS: Contagem de Células Somáticas x 1.000; EPM: Erro padrão médio. Médias avaliadas nas linhas para teste de Tukey ($P < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à Contagem de Células Somáticas (CCS). Os valores permitidos pela normativa IN 76 (BRASIL, 2018) é de 500.000 células/ mL^{-1} . Os animais submetidos ao tratamento IFDMO apresentaram os menores valores de CCS. De acordo com os dados obtidos da CCS, o tratamento com IFDMO foi tão eficiente quanto o tratamento com iodo não diferido estatisticamente na composição físico-química do leite produzindo. Estes resultados indicam a viabilidade da utilização da IFDMO tendo a Sf como fotossensibilizador, aplicada em baixa concentração e garantindo a redução da proliferação de microrganismos pós ordenha e manutenção da qualidade do leite produzido.

Conclusões

O uso da IFDMO tendo Sf como fotossensibilizador mostrou-se eficiente na aplicação como pós dipping podendo substituir a aplicação convencional com iodo. A Sf atuou de forma eficaz na diminuição da contagem de células somáticas e prevenção de quadros de mastite subclínica, indicando a viabilidade da utilização da IFDMO para o tratamento de mastite bovina.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, Grupo de Pesquisa EEQUAM, UEM.

Referências

SELLERA F.P, SABINO C.P, RIBEIRO M.S, GARGANO R.G, BENITES N.R, Melville P.A, et al. In vitro photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 13, p. 276-81, 2016.

DA SILVA JUNIOR, R. C, CAMPANHOLI, K. S. S, DE MORAIS, F. A. P, DOS SANTOS POZZA, M. S, DOS SANTOS, G. 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, 2019.

CAMPANHOLI, K. S. S., BRAGA, G, DA SILVA, J. B, DA ROCHA, N. L, DE FRANCISCO, L. M. B, DE OLIVEIRA, É. L, BRUSCHI, M. L, HOSHINO, L, SATO, F, HIOKA, N. CAETANO, W. Biomedical Platform Development of Chlorophyll-based extract for Topic Photodynamic Therapy: Mechanical and Spectroscopic Properties. **Langmuir**, v. 34, n. 28, p. 8230-8244, 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PEA, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado,. Instrução Normativa 76. 26 DE NOVEMBRO DE 2018.