

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE

Isabel da Silva Knupp (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ranulfo Combuca da Silva Junior, Marcelo Henrique de Sá Silverio, Bruna Moura Rodrigues, Bruna Barnei Saraiva, Magali Soares dos Santos Pozza (Orientadora), e-mail: Isabelsknupp@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias /Maringá, PR.

Zootecnia/ Produção Animal

Palavras-chave: Microbiologia, mastite, fotoinativação.

Resumo: A mastite é uma enfermidade que acomete a glândula mamaria, tendo como uma das principais causas as bactérias do gênero *Staphylococcus*. O presente trabalho objetivou avaliar inativação fotodinâmica de microrganismos como uma alternativa ao controle da mastite. Foram determinadas concentração inibitória mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* frente a solução a base do fotossensibilizador Safranina-O, irradiada com fonte de luz verde. Os valores de MIC (MBC) para safranina em *S. aureus* e *E. coli* irradiados foram 9,4 (37,5) µg / mL, 9,4 (9,4) µg / mL, respectivamente. Além disso, os valores de MIC (MBC) para safranina em *S. aureus* e *E. coli* não irradiados foram 18,7 (150,0) µg / mL, 150,0 (> 150,0) µg / mL, respectivamente. A irradiação das placas se mostrou eficiente para o controle bactericida.

Introdução

A mastite é uma doença infecciosa frequentemente causada por bactérias que afetam a glândula mamaria (SILVA JUNIOR, 2019).

Diversas variedades de microrganismos podem estar relacionadas à mastite em caprinos, sendo os principais agentes etiológicos da infecção intramamária, as bactérias do gênero *Staphylococcus*, com prevalência das espécies caracterizadas como coagulase positiva (CONTRERAS et al., 2007).

A técnica de inativação fotodinâmica de microrganismos consiste no uso de fotossensibilizadores (FS), sendo compostos (corantes naturais e/ ou sintéticos) que com um comprimento de onda adequado, absorvem um fóton de luz visível, fazendo que se tornem ativados (PLAETZER et al. 2009). Quando estão no estado excitado, ocorre a transferência de energia do FS para o oxigênio molecular (O₂), o que gera a formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente o oxigênio singlete (¹O₂), que possuem a capacidade de reagir com biomoléculas e estruturas celulares, gerando a morte de microrganismos (SILVA JUNIOR, 2020).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) de Safranina frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Materiais e métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Leite pertencente ao Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (CMETL) região Noroeste, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi - Universidade Estadual de Maringá. As cepas isoladas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - CCA - da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC) foi utilizada uma solução a base do fotossensibilizador Safranina-O (Sf) ([Cloreto de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenilfenazina] (Sf) 85% MM = 350,84 g.mol⁻¹ Sigma-Aldrich – São Paulo, Brasil), o surfactante F127 (Pluronic®) e tampão McIlvaine (7.5 mmol L⁻¹, pH 7,2), onde 2g de F127 foi diluído e m 50 ml de tampão McIlvaine (7.5 mmol L⁻¹, pH 7,2), e então acrescentou-se 0,0075g de Safranina-O a esta solução. E como fonte de luz, LED verde com dose de luz 6,48 J/cm².

A determinação dos valores de MIC foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando Caldo Mueller-Hinton (CHM). Foram utilizadas placas de 96 poços, sendo distribuídos 100 µl de CMH em cada poço, em seguida sendo acrescentado 100 µl de Sf na concentração de 2000 µg/mL (1000µg/mL no primeiro poço), prosseguindo a diluição seriada, homogeneizando e transferindo 100 µL para o poço seguinte até o último poço. As suspensões microbianas serão padronizadas em salina 0,9% e diluídas 1:10 em CMH sendo acrescentados 5 µL do inóculo em cada poço da placa. As duplicatas das microplacas foram iluminadas por 30 min (claro) e as outras microplacas foram mantidas sem iluminação (escuro) sendo então incubadas a 37 °C por 24h (SILVA JUNIOR, 2019).

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC), será realizada por meio da técnica do subcultivo em Ágar Mueller Hinton retirando-se 10 µL de cada poço onde houve inibição

Resultados e Discussão

Os valores de MIC e MBC foram menores para as placas que foram irradiadas, evidenciando seu efeito inibidor. O F-127 também foi testado e não mostrou efeito antibacteriano sobre *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 1 - Valores de MIC e MBC frente as cepas testadas

Compostos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Safranina (com irradiação)	9.4 µg/mL	37.5 µg/mL	9.4 µg/mL	9.4 µg/mL
Safranina (sem irradiação)	18.7 µg/mL	150.0 µg/mL	150.0 µg/mL	>150.0 µg/mL

Rodrigues et al. (2021) avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de safranina-O fotoativada frente a cepas de *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino, como resultado obtiveram CIM foi de 18,75 mg/mL para todos os isolados de *S. aureus* e a CBM variou de 18,75 (SV3) a 75,0 (SV5) mg/mL. Para *P. fluorescens* a CIM variou de 4,69 mg/mL (PVh) a 18,75 mg/mL (PV1), com CBM de 37,5 mg/mL para ambos isolados. Os autores constaram ainda que sem irradiação a Sf não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

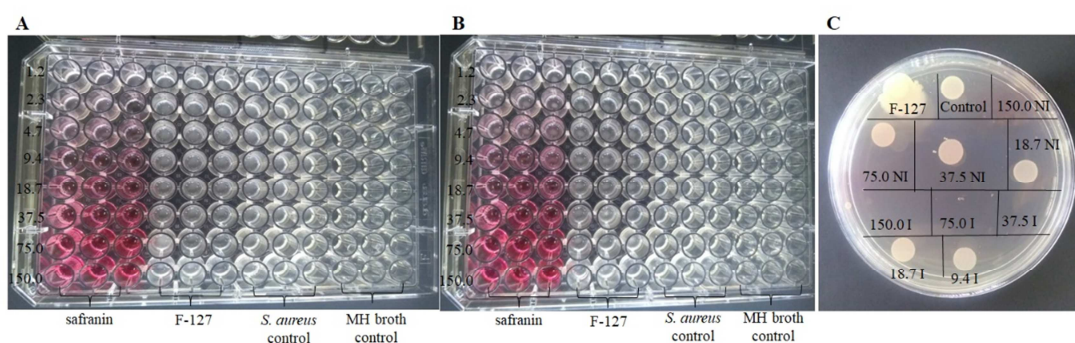


Figura 1. Ensaio de microdiluição em caldo. (A) Avaliação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) de safranina em *Staphylococcus aureus* irradiado. (B) Avaliação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) de safranina em *Staphylococcus aureus* não irradiado. (C) Avaliação das concentrações bactericidas mínimas (MBC) de safranina em *Staphylococcus aureus*.

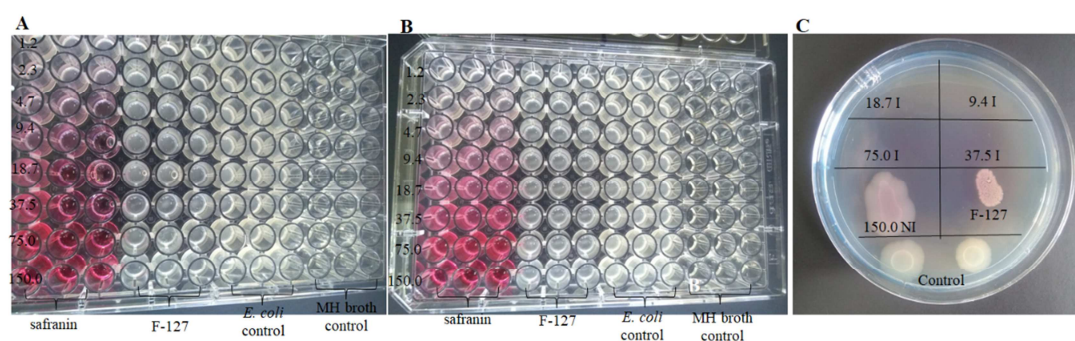


Figura 2. Ensaio de microdiluição em caldo. (A) Avaliação de concentrações inibitórias mínimas (CIM) de safranina em *Escherichia coli* irradiada. (B) Avaliação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) de safranina em *Escherichia coli* não irradiada. (C) Avaliação das concentrações bactericidas mínimas (MBC) de safranina em *Escherichia coli*.

Conclusões

Conclui-se que o uso da terapia fotodinâmica apresenta-se como uma boa alternativa para controle de mastite, porém testes *in vivo* são necessários para comprovação da efetividade.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa para realização do trabalho.

Referências

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SANCHES, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, p.145-153, 2007.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009.

SILVA JUNIOR, R. C.; CAMPANHOLI, K. D. 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 Pigm.**, v. 167, p. 204–215, 2019.

SILVA JUNIOR, R. C.; CAMPANHOLI, K. D. S.; MORAIS, F. A.; POZZA, M. S. D. S.; CASTRO- HOSHINO, L. V.; BAESSO, M. L.; et al. Photothermal stimuli-responsive hydrogel containing safranin for mastitis treatment in veterinary using phototherapy. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 1, p. 581–596, 2020.

RODRIGUES, B. M.; SARAIVA, B. B.; SILVA JUNIOR, R. C.; CAETANO, W.; POZZA, M. S. S. Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima de Safranina-O fotoativada frente a *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino. In: 30º Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2021. **Anais ...** online, 2021.