FÁBIO PARRA SELLERA

Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina

São Paulo

2014

FÁBIO PARRA SELLERA

Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Clínica Veterinária da Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2974
FMVZ

Sellera, Fábio Parra
Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina / Fábio Parra Sellera. –
2014.
105 f. f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento Clínica Médica, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani.

1. Terapia fotodinâmica. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. *Streptococcus* spp.
4. *Corynebacterium bovis*. 5. *Prototheca zopfii*. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 02 de abril de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina", protocolado sob o CEUA nº 2246120214, sob a responsabilidade de Fabio Celidonio Pogliani, foi aprovado na reunião de 12/03/2014, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "", protocol number CEUA 2246120214, under the responsibility Fabio Celidonio Pogliani, was approved in the meeting of day 03/12/2014, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SELLERA, Fábio Parra

Título: Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, que sempre me mostrou um caminho a seguir.

Aos meus pais, Manoel e Débora por terem me ensinado os reais valores da vida, por todo seu amor, apoio e incentivo durante a minha formação.

Aos meus irmãos Felipe e Fernanda, que compartilharam momentos inesquecíveis da minha vida.

À minha namorada Fernanda, por toda paciência, incentivo, cumplicidade, companheirismo e amor.

Aos meus cunhados Carla e Erick, por sempre trazerem palavras de conforto nos momentos de dificuldade.

Aos meus sobrinhos Yasmin, Giovana, Sofia e Guilherme, pelos momentos de descontração que por várias vezes me acalmaram durante o desenvolvimento deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Fabio Celidonio Pogliani**, por acreditar no meu trabalho, por todos os incentivos, orientações e amizade nesta jornada.

Ao Prof. Dr. **Milton Ricardo Azedo**, por ter me iniciado na vida acadêmica e por seus sábios conselhos.

À Prof^a. Dr^a. **Martha Simões Ribeiro**, que me abriu as portas do seu laboratório, por seus ensinamentos sobre Laserterapia e Terapia Fotodinâmica, por seu apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. **Fernando José Benesi**, pela amizade, confiança e pelos ensinamentos sobre Buiatria.

Ao Prof. Dr. **Nilson Roberti Benites** e **Priscilla Anne Melville**, pela colaboração com os micro-organismos e pelos ensinamentos sobre Microbiologia.

À Prof^a. Dr^a. **Alice Maria Melville Paiva Della Libera** pelas conversas, por suas palavras de conforto e de sabedoria.

Ao meu colega de pós-graduação e grande amigo **Ronaldo Gomes Gargano**, por me ensinar sobre persistência e comprometimento na pesquisa.

Ao **Caetano Padial Sabino**, a quem sem a participação este trabalho não seria possível de ser realizado, pela incansável colaboração, pela paciência, ensinamentos e apoio sempre que precisei.

Ao meu amigo **Luciano Cacciari**, pelo convívio, pela amizade e pelo incentivo.

À **Bruna Stanigher**, pela amizade e principalmente pela paciência.

Aos meus sogros **Rodrigues** e **Vera**, pelos conselhos e incentivos.

Ao meu grande amigo **Cláudio Roberto**, pela simplicidade e pelos inesquecíveis dias de mergulho.

Aos demais professores, residentes, funcionários e colegas de pós-graduação, que de alguma forma colaboram e compartilharam comigo suas experiências.

“Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro; a real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz”.

Platão

RESUMO

SELLERA, F. P. **Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina.** [Photoinactivation of bovine mastitis pathogens]. 2014. 105 f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A mastite bovina destaca-se negativamente no cenário mundial em decorrência aos prejuízos ocasionados pelo seu dispendioso tratamento, sendo considerada a principal doença que acomete a pecuária leiteira. Como alternativa ao uso de antibióticos, a terapia fotodinâmica se apresenta como uma opção terapêutica no tratamento de infecções locais, que atua sem que haja seleção de micro-organismos resistentes. Seu mecanismo de ação resulta da interação entre uma substância fotossensibilizadora e luz em comprimento de onda ressonante, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio que apresentam ação citotóxica contra micro-organismos. O objetivo deste estudo foi investigar a habilidade da terapia fotodinâmica, *in vitro*, para inativar cepas causadoras da mastite bovina. Culturas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Prototheca zopfii* suspensas em PBS foram estimadas por meio da turbidez da suspensão correspondendo à concentração de 10^7 UFC/mL, caracterizando desta forma, oito grupos avaliados: controle (C), luz – LED vermelho (L) $\lambda=660\text{nm}$ /2 minutos de irradiação ($12,22\text{J}/\text{cm}^2$), AM (azul de metileno - 1mM), PDT 5 segundos ($0,50\text{J}/\text{cm}^2$), PDT 10 segundos ($1,01\text{J}/\text{cm}^2$), PDT 30 segundos ($3,05\text{J}/\text{cm}^2$), PDT 1 minuto ($6,11\text{J}/\text{cm}^2$) e PDT 2 minutos ($12,22\text{J}/\text{cm}^2$) de irradiação. Os grupos tratados com AM e Luz isoladamente não apresentaram ação citotóxica sobre os micro-organismos avaliados. *S. dysgalactiae*, *S. aureus*, *C. bovis* foram inativados sob 30 segundos de irradiação ($3,05\text{J}/\text{cm}^2$); *S. agalactiae* e *P. zopfii* foram inativados sob 2 minutos de irradiação ($12,22\text{J}/\text{cm}^2$).

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus* spp. *Corynebacterium bovis*. *Prototheca zopfii*.

ABSTRACT

SELLERA, F. P. **Photoinactivation of bovine mastitis pathogens**. [Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina]. 2014. 105 f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Bovine mastitis stands out negatively on the world scenario due to the damage caused by its expensive treatment, being considered the main disease affecting dairy cattle. As an alternative to antibiotics, photodynamic therapy is presented as a therapeutic option in the treatment of local infections, which acts without any selection of resistant microorganisms. Its mechanism of action results from the interaction between a photosensitizing substance and light in the resonant wavelength, promoting the formation of reactive oxygen species, which have cytotoxic activity against micro -organisms. The aim of this study was to investigate, in vitro, the ability of photodynamic therapy to inactivate strains that cause bovine mastitis. Cultures of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* and *Prototheca zopfii* suspended in PBS were estimated by the turbidity of the suspension corresponding to a concentration of 10^7 CFU / mL, characterizing eight study groups: control (C), light - red LED (L) $\lambda = 660\text{nm}$ / 2 minutes of irradiation ($12.22\text{J}/\text{cm}^2$), BM (methylene blue - 1 mM), PDT 5 seconds ($0.50\text{ J}/\text{cm}^2$), PDT 10 seconds ($1.01\text{J}/\text{cm}^2$), PDT 30 seconds ($3.05\text{ J}/\text{cm}^2$), PDT 1 minute ($6.11\text{ J}/\text{cm}^2$) and PDT 2 minutes ($12.22\text{ J}/\text{cm}^2$) of irradiation. The groups treated with methylene blue and light alone had no cytotoxic effect on microorganisms evaluated. *S. dysgalactiae*, *S. aureus*, *C. bovis* were inactivated after 30 seconds of irradiation ($3.05\text{ J}/\text{cm}^2$); *S. agalactiae* and *P. zopfii* were inactivated after 2 minutes of irradiation ($12.22\text{ J}/\text{cm}^2$).

Keywords: Photodynamic therapy. *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus* spp. *Corynebacterium bovis*. *Prototheca zopfii*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados (média $\pm$ erro padrão) do logaritmo da UFC/mL, segundo o micro-organismo e o tratamento aplicado – São Paulo – 2014.....	80
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fonte de luz empregada no experimento (LED vermelho, $\lambda=660\text{nm} \pm 15$, 320mW, diâmetro de 2cm, irradiância de $100\text{mw}/\text{cm}^2$) – São Paulo – 2014.....	43
Figura 2 -	Transmitância na suspensão de PBS estéril com os micro-organismos em $10 \pm 1\%$, correspondente à concentração de 10^7 UFC/mL – São Paulo – 2014.....	45
Figura 3 -	Preparação dos inóculos nos oito grupos avaliados – São Paulo – 2014.....	46
Figura 4 -	Sequência do preparo das amostras bacterianas dos grupos C – São Paulo – 2014.....	50
Figura 5 -	Sequência do preparo das amostras bacterianas dos grupos L – São Paulo – 2014.....	51
Figura 6 -	Sequência do preparo das amostras bacterianas dos grupos AM – São Paulo – 2014.....	52
Figura 7 -	Sequência do preparo das amostras de <i>P. zopfii</i> do grupo C – São Paulo – 2014.....	54
Figura 8 -	Sequência do preparo das amostras de <i>P. zopfii</i> do grupo L – São Paulo – 2014.....	55
Figura 9 -	Sequência do preparo das amostras de <i>P. zopfii</i> do grupo AM – São Paulo – 2014.....	56
Figura 10 -	Sequência do preparo das amostras bacterianas e de <i>P. zopfii</i> dos grupos PDT – São Paulo – 2014.....	58
Figura 11 -	Diluição das amostras em placa de Wells – São Paulo – 2014.....	60
Figura 12 -	Diluição das amostras em placa de Wells (C= controle, L= LED vermelho 660nm, AM= azul de metileno, 5s, 10s, 30s, 1' e 2' = grupos irradiados) – São Paulo – 2014.....	61
Figura 13 -	Diluições selecionadas para serem semeadas das amostras bacterianas dos Grupos C, L e AM – São Paulo – 2014.....	62
Figura 14 -	Diluições selecionadas para serem semeadas das amostras de <i>P. zopfii</i> dos Grupos C, L e AM – São Paulo – 2014.....	63
Figura 15 -	Diluições selecionadas para serem semeadas das amostras bacterianas e de <i>P. zopfii</i> dos Grupos PDT – São Paulo – 2014.....	64
Figura 16 -	Ilustração das UFC/mL semeadas em forma de estria – São Paulo – 2014	65
Figura 17 -	Placa de Petri apresentando colônias de <i>S. dysgalactiae</i> semeadas a partir de diferentes diluições do grupo Controle – São Paulo – 2014.....	72
Figura 18 -	Placa de Petri apresentando colônias de <i>S. dysgalactiae</i> semeadas a partir de diferentes diluições do grupo AM – São Paulo – 2014.....	73
Figura 19 -	Placa de Petri apresentando colônias de <i>S. dysgalactiae</i> semeadas a	

	partir de diferentes diluições do grupo L – São Paulo – 2014.....	74
Figura 20 -	Placa de Petri apresentando colônias de <i>S. dysgalactiae</i> semeadas a partir de diferentes diluições do grupo PDT 5s – São Paulo – 2014.....	77
Figura 21 -	Placa de Petri apresentando colônias de <i>S. dysgalactiae</i> semeadas a partir de diferentes diluições do do grupo PDT 10s – São Paulo – 2014.....	77
Figura 22 -	Placa de Petri não apresentando crescimento de <i>S. dysgalactiae</i> semeados a partir de diferentes diluições do grupo PDT 30s – São Paulo – 2014.....	78
Figura 23 -	Placa de Petri não apresentando crescimento de <i>S. dysgalactiae</i> semeados a partir de diferentes diluições do grupo PDT 1min – São Paulo – 2014.....	78
Figura 24 -	Placa de Petri não apresentando crescimento de <i>S. dysgalactiae</i> semeados a partir de diferentes diluições do grupo PDT 2min – São Paulo – 2014.....	79
Gráfico 1 -	Média (UFC/mL) resultantes após os diferentes tratamentos aplicados – Controle, Luz, Azul de metileno, PDT 5s, PDT 10s, PDT 30s, PDT 1min e PDT 2min – São Paulo – 2014.....	81
Gráfico 2 -	Médias, em UFC/mL, de <i>Staphylococcus aureus</i> de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014.....	82
Gráfico 3 -	Médias, em UFC/mL, de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014.....	82
Gráfico 4 -	Médias, em UFC/mL, de <i>Streptococcus agalactiae</i> de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014.....	83
Gráfico 5 -	Médias, em UFC/mL, de <i>Corynebacterium bovis</i> de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014.....	83
Gráfico 6 -	Médias, em UFC/mL, de <i>Prototeca zopfii</i> de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014.....	84
Gráfico 7 -	Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de <i>S. aureus</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>C. bovis</i> e <i>P. zopfii</i> – São Paulo – 2014.....	84
Quadro 1 -	Relação entre micro-organismo, meio de cultura e tempo de crescimento – São Paulo – 2014.....	42
Quadro 2 -	Preparo da diluição das amostras bacterianas em placa de Wells. C=controle absoluto; L=LED vermelho 660nm; MB= Azul de metileno; 5s, 10s, 30s, 1' e 2' = grupos PDT de tempos de irradiação – São Paulo – 2014.....	47
Quadro 3 -	Preparo da diluição das amostras de <i>P. zopfii</i> em placa de Wells. C=controle absoluto; L=LED vermelho 660nm; MB= Azul de metileno; 5s, 10s, 30s, 1' e 2' = grupos PDT de tempos de irradiação – São Paulo –	

	2014.....	48
Quadro 4 -	Resultado dos testes de suscetibilidade <i>in vitro</i> para <i>S. dysgalactiae</i> frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014.....	68
Quadro 5 -	Resultado dos testes de suscetibilidade <i>in vitro</i> para <i>S. agalactiae</i> frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014.....	69
Quadro 6 -	Resultado dos testes de suscetibilidade <i>in vitro</i> para <i>S. aureus</i> frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014.....	70
Quadro 7 -	Resultado dos testes de suscetibilidade <i>in vitro</i> para <i>C. bovis</i> frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	azul de metileno
AT	azul de toluidina
ATP	trifostato de adenosina
BHI	brain heart infusion
CCS	contagem de células somáticas
CLA	Centro de Lasers e Aplicações
cél	célula
CIM	concentração inibitória mínima
CMT	California Mastitis Test
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROS	espécies reativas de oxigênio
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FS	fotossensibilizador
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KCI	cloreto de potássio
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
LED	light-emitting diode
LPS	lipopolissacarídeo
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	cloreto de sódio
PBS	solução tamponada fosfatada
PDT	photodynamic therapy
RNA	ácido ribonucleico
SP	São Paulo
UFC	unidades formadoras de colônia
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
WMT	Winconsin Mastitis Test

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
±	mais ou menos
°C	graus Celsius
cm	centímetros
g	gramas
J	Joules
L	litros
Log	logarítmo
mA	miliamperagem
mL	mililitros
mM	milimolar
mW	miliwatts
mWcm ²	miliwatts por centímetro quadrado
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
UFC	unidades formadoras de colônia
UI	unidades internacionais
W	Watt
α	alfa
β	beta
γ	gama
λ	lambda
μg	microgramas
μL	microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	MASTITE BOVINA.....	20
2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	25
2.1.2	<i>Streptococcus spp</i>.....	26
2.1.2.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	27
2.1.2.2	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	27
2.1.3	<i>Corynebacterium bovis</i>.....	28
2.1.4	<i>Prototheca zopfii</i>.....	29
2.2	RESISTÊNCIA MICROBIANA.....	30
2.3	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	33
2.3.1	Histórico da Terapia Fotodinâmica.....	33
2.3.2	Mecanismo de ação.....	36
2.3.3	Terapia Fotodinâmica com fenotiazínicos.....	37
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.1.1	Objetivos específicos.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	MICRO-ORGANISMOS.....	41
4.2	TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.....	42
4.3	FONTE DE LUZ.....	43
4.4	FOTOSENSIBILIZADOR.....	44

4.5	PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	44
4.6	PREPARO DA DILUIÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	47
4.7	PREPARO DA DILUIÇÃO DE <i>PROTOTHECA ZOPFII</i>	47
4.8	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	48
4.8.1	Grupos C, L e AM - Bactérias	48
4.8.2	Grupos C, L e AM - <i>Prototheca zopfii</i>	53
4.8.3	Grupos PDT– Bactérias e <i>Prototheca zopfii</i>	57
4.9	DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	59
4.10	CONTAGEM DE COLÔNIAS.....	62
4.10.1	Grupos C, L e AM (Bactérias)	62
4.10.2	Grupos C, L e AM (<i>Prototheca zopfii</i>)	63
4.10.3	Grupo PDT (Bactérias e <i>Prototheca zopfii</i>)	63
4.10.4	Tempo de incubação para contagem	64
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.1	ANTIBIOGRAMA.....	67
6.2	FOTOINATIVAÇÃO.....	71
7	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil detém o segundo maior número de vacas leiteiras do mundo, com aproximadamente 40.000.000 de animais. Deste efetivo, 16.151.001 são vacas ordenhadas que produzem 24 milhões de toneladas de litros de leite. Apesar de números aparentemente expressivos, ao sair da esfera quantitativa e passar à qualitativa, percebe-se que a produtividade e os índices nacionais (5,52 litros/cabeça/dia), quando comparados com países que possuem um rebanho leiteiro inferior, ficam muito abaixo dos mínimos desejados por uma empresa rural eficiente (ZOCCAL; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2012). O baixo volume de produção pode ser atribuído a erros de manejo e/ou enfermidades que prejudiquem ou impeçam a produção de leite propriamente dita.

Dentre as enfermidades que mais comprometem a produção leiteira, a mastite bovina assume papel de destaque. Sendo caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária, a qual acarreta diretamente na queda de produção e a qualidade do leite, implicando em despesas com medicamentos e mão de obra especializada, descarte do leite, perda funcional de glândulas e, por vezes, morte do animal (BRADLEY, 2002; ROBERSON, 2012).

A mastite bovina destaca-se negativamente no sistema de produção mundial principalmente pelo grande impacto econômico acarretado, sendo considerada a doença mais dispendiosa entre as que acometem a produção leiteira. As elevadas perdas econômicas ocasionadas pela evolução da doença tornam a mastite bovina uma das doenças mais combatidas na bovinocultura (LESCOURRET; COULON, 1994; KOSSAIBATI; ESSLEMONT, 1997; HORTET; SEEGER, 1998).

A ocorrência desta enfermidade depende diretamente da interação de fatores relacionados ao animal, homem, ambiente e, na maioria dos casos, a presença de micro-organismos patogênicos que, ao se instalarem no hospedeiro, desencadeiam um processo inflamatório. As bactérias estão entre os principais agentes causadores da mastite bovina, contudo fungos, leveduras, vírus e algas também são correlacionados com a doença (ROBERSON, 2012; DEB et al., 2013).

O controle de micro-organismos patogênicos é um dos campos mais desafiadores na área farmacológica. Hoje, o desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novos fármacos (SOUZA, 1998; MATEU; MARTIN, 2001), deste modo, a indústria farmacêutica está em constante alerta, principalmente devido à rápida capacidade de adaptação e diversidade dos patógenos encontrados. O aparecimento de uma maior variedade de micro-organismos resistentes faz com que haja um grande aumento da morbidade de infecções que eram facilmente tratadas no passado. Portanto, antibióticos sistêmicos deveriam ser utilizados com maior precaução e principalmente com alvo específico, evitando assim maior desenvolvimento de resistência bacteriana, sendo recomendado que infecções locais não deveriam ser tratadas de forma sistêmica caso houvesse alternativa viável (BAGNATO, 2007)

Segundo Costa (2002), o tratamento ideal para mastite bovina seria capaz de combater a infecção sem prejudicar a glândula mamária ou apresentar resíduos de medicamentos no leite. Torna-se essencial, portanto, buscar novas alternativas terapêuticas de forma a rever práticas amplamente empregadas no passado que influenciam diretamente ou indiretamente à produção leiteira.

A Terapia Fotodinâmica ou PDT (Photodynamic Therapy) torna-se uma modalidade terapêutica que vem ao encontro da maioria das vantagens, principalmente por não apresentar efeitos sistêmicos e microbiológicos indesejáveis, os quais podem ser encontrados na maioria dos tratamentos habituais que envolvem o emprego de antibióticos (HAMBLIN; HASAN, 2004; HAIDARIS et al., 2013; HANAKOVA et al., 2014).

A PDT se destaca como modalidade terapêutica que envolve o uso de um agente fotossensibilizador, luz de comprimento de onda específico e oxigênio molecular para destruir tanto células neoplásicas como também micro-organismos (bactérias, vírus, fungos e parasitas), com ausência de efeitos genotóxicos e mutagênicos, o que, conseqüentemente, impede o desenvolvimento de resistência microbiana (HAMBLIN; HASAN, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

Recentemente, estudos têm demonstrado a eficácia da PDT *in vitro* e *in vivo* no controle e tratamento de micro-organismos causadores de enfermidades em seres humanos (BROWN, 2012; GILABERTE et al., 2014) e animais (HAYEK et al., 2005; JORI et al., 2011; WARDLAW et al., 2012; PIRES et al., 2013; PIRES et al.,

2014). Contudo, maior investigação é necessária para que futuramente protocolos terapêuticos estipulados em condições laboratoriais possam ser extrapolados em ensaios clínicos de condições naturais de ocorrência destas doenças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, será realizada revisão de literatura acerca da mastite bovina, bem como dos principais micro-organismos envolvidos nesta enfermidade e utilizados nesta pesquisa.

2.1 MASTITE BOVINA

Devido ao seu alto valor nutricional, o leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos para a alimentação do ser humano (GERMANO; GERMANO, 1995), tornando-se fundamental que este alimento esteja dentro das normas vigentes que abrangem o controle de condições higiênicas e sanitárias (RUEGG, 2003). Quadros de alterações patológicas da glândula mamária, caracterizados principalmente por meio das mastites, alteram significativamente as características do leite e, por sua vez, comprometem também sua importância nutricional.

A palavra mastite é originária do idioma grego *mastos*, que significa “mama” e *itis*, que significa “inflamação”. É caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária decorrente a diferentes fatores, sendo a infecção por micro-organismos a principal razão de seu aparecimento. Ao lado dos problemas reprodutivos e das afecções podais, esta enfermidade é considerada uma das principais causas de perdas relacionadas à produção e a qualidade do leite (KOSSAIBATI, ESSLEMONT, 1997; BRADLEY, 2002).

Segundo Kossaibati (2000), a média do custo por caso de mastite clínica foi estimada em £175, ainda em estudo realizado por Bradley (2002), o autor concluiu que a mastite clínica pode resultar em um prejuízo de £168 milhões às indústrias de laticínios do Reino Unido.

Geralmente, esta doença resulta em modificações patológicas no tecido glandular, causando frequentemente alterações na secreção láctea, com presença de grumos, sangue, pus, aumento do número de leucócitos e descoloração do leite, assim como alterações nas características organolépticas do leite e nas condições

clínicas do órgão acometido, com presença de edema, aumento de temperatura local, dor e endurecimento na glândula mamária (ROBERSON, 2012).

Quando de origem infecciosa, os micro-organismos envolvidos na gênese da mastite bovina são classificados, epidemiologicamente, em contagiosos e ambientais de acordo com a origem do patógeno (BLOWEY; EDMONDSON, 1995), sendo frequentemente associada à presença de fungos (ZHOU et al., 2013), bactérias (BRADLEY, 2002), algas (RICCHI et al., 2013) ou vírus (WELLENBERG; VAN DER POEL; VAN OIRSCHOT, 2002).

A mastite contagiosa ocorre principalmente durante a ordenha, sendo que fatores como falta de higiene das mãos do ordenhador, da ordenhadeira ou de recipientes utilizados para a antissepsia dos tetos facilitam diretamente a ocorrência da doença. A principal fonte de infecção na mastite contagiosa é o leite contaminado que, de certa forma, transporta os patógenos que habitam a glândula mamária para o meio externo (SCHUKKEN et al., 1988). A mastite ambiental, por sua vez, é proveniente da penetração de micro-organismos encontrados no ambiente contaminado que encontram na glândula mamária um substrato favorável para seu desenvolvimento (HOWELL, 1972). Apesar de mais de 140 espécies de micro-organismos já terem sido descritos como agentes causadores da mastite, apenas um número pequeno é responsável pela maior incidência da doença (PHILPOT; NICKERSON, 2000).

Outra classificação da doença pode ser atribuída à mastite, podendo esta ser classificada clinicamente em catarral, apostematosa e flegmonosa. A mastite catarral é caracterizada por um processo inflamatório superficial que, na maioria das vezes, revela secreção láctea com pequenas alterações, como a presença de grumos. A mastite apostematosa pode ser classificada como o processo inflamatório mais intenso, associado à presença de pus e formação de abscessos. A mastite flegmonosa, por sua vez, atinge todos os tecidos da glândula mamária e se destaca como um quadro mais grave da doença adquirindo, frequentemente, repercussões sistêmicas (GREGORY et al., 2001).

Devido a sua importância econômica, o tratamento da mastite bovina vem sendo investigado possivelmente desde a domesticação destes animais e, apesar dos diferentes princípios ativos desenvolvidos para o seu tratamento, ainda não há um consenso sobre qual a melhor abordagem terapêutica. De modo geral, a adoção de medidas higiênico-sanitárias e a administração de antibióticos intramamários

podem ser considerados os procedimentos mais utilizados para o tratamento e profilaxia da doença (ERSKINE et al., 1993; BRADLEY, 2002).

O diagnóstico desta doença baseia-se em manifestações clínicas, como aumento de temperatura da glândula mamária, enrijecimento do tecido acometido e presença de grumos no leite, bem como em exames complementares, que indicam o aumento de células somáticas no leite, e o microbiológico. Em mastites assintomáticas ou inaparentes, ou seja, na ausência de manifestações clínicas detectáveis por meio do exame direto da glândula mamária, há a necessidade da realização de exames indiretos para a detecção, principalmente, do aumento de células somáticas, as quais representam fundamentalmente a resposta do sistema imune.

Quando um micro-organismo patogênico se aloja na glândula mamária, o organismo do hospedeiro responde por meio de células de defesa, principalmente leucócitos polimorfonucleares, para combater o processo infeccioso. Estes leucócitos, somados às células de descamação do epitélio secretor, são denominados células somáticas (PEDERSEN et al., 2003). Na presença de processo infeccioso na glândula mamária, a contagem de células somáticas (CCS) encontra-se elevada (acima de 300.000 cél./mL de leite), contudo, fatores fisiológicos, tais como idade do animal, estresse, fase da lactação, entre outros, podem interferir no resultado (BEAUDEAU et al., 2002).

Alguns testes indiretos podem ser realizados para avaliar a proporção de células somáticas no leite e caracterizar a mastite inaparente, em destaque, temos o Califórnia Mastitis Test (CMT), o Wisconsin Mastitis Test (WMT) e a contagem eletrônica de células somáticas (RUPP; BEAUDEAU; BOICHARD, 2000). Entretanto, o CMT tornou-se o teste mais popular, sendo seu resultado estimado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e do reagente (ESSLEMONT; KOSSAIBATI, 2002).

O tratamento convencional da doença consiste no emprego de fármacos antimicrobianos administrados diretamente através do canal do teto ou sistemicamente, em decorrência a sua gravidade e comprometimento do estado físico do animal (ERSKINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003; HILLERTON; BERRY, 2005; BARLOW, 2011; ROBERSON, 2012; DEB et al., 2013).

De modo geral, o emprego destes fármacos deve ser feito com ressalvas, principalmente em relação ao micro-organismo alvo, uma vez que a administração

errônea destes fármacos tem como consequência o desenvolvimento de resistência microbiana, inviabilizando tratamentos futuros e ocasionando a seleção de micro-organismos resistentes ao princípio ativo (OLIVER; MURINDA; JAYARAO, 2011; OLIVER; MURINDA, 2012).

Indiscutivelmente, o emprego de agentes antimicrobianos na pecuária vem auxiliando no tratamento e controle de doenças que acometem estes animais, todavia, a presença de resíduos destes medicamentos no leite tem se mostrado um dos maiores empecilhos à indústria de alimentos, afetando a fabricação de produtos lácteos, além de proporcionar riscos diretos à saúde pública como hipersensibilidade, alterações no equilíbrio da microbiota intestinal, efeitos teratogênicos e resistência a uma série de princípios ativos que compõem os medicamentos antibióticos, devido ao tratamento sistêmico e/ou intramamário de animais em lactação. Dessa forma, o controle da contaminação química no leite é um ponto crítico dentro da produção leiteira (CULLOR, 1993; SISCHO, 1996; MOATS, 1997; REDDING et al., 2014¹ no prelo).

Nas últimas décadas, a crescente preocupação dos órgãos de fiscalização e consumidores com a persistência de resíduos de medicamentos em produtos lácteos vem desencadeando uma série de pesquisas que perduram até os dias atuais (WRIGHT, 1981; CONZUELO et al., 2013; EHLING; REEDY, 2013). Além disto, o uso contínuo ou indiscriminado de agentes antimicrobianos no tratamento da mastite bovina vem desencadeando um processo de seleção nos micro-organismos, desenvolvendo linhagens resistentes aos princípios ativos (DUIJKEREN et al., 2004; MOON et al., 2007). Torna-se, portanto, necessário cada vez mais pesquisas que busquem o tratamento eficaz de enfermidades de etiologia microbiológica por meio de agentes antimicrobianos que não determinem o aparecimento de resíduos nos produtos de origem animal, bem como não promovam a seleção de populações resistentes ao produto.

A expressão “patógeno principal” pode ser designada aos principais micro-organismos causadores da mastite. Contudo, não existe uma definição absoluta que esteja de acordo em relação à classificação de patógenos primário e secundário. Frequentemente, a interação entre alta prevalência, a qual pode variar em

¹ REDDING, L. E.; CUBAS-DELGADO, F.; SAMMEL, M. D.; SMITH, G.; GALLIGAN, D. T.; LEVY, M. Z.; HENNESSY, S. Antibiotic residues in milk from small dairy farms in rural Peru. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, 2014. (No Prelo).

decorrência da localidade, a natureza contagiosa, o potencial de causar infecções e os custos dos tratamentos para debelar as mesmas, determinam se o patógeno pode ser classificado como primário ou secundário na epidemiologia da mastite bovina (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997; RADOSTITS et al., 2007; GONÇALVES, 2012).

Segundo Bradley e Green (2005), os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* são os principais responsáveis pela redução na qualidade do leite por provocarem resposta imunológica em diferentes intensidades. Também, estudos demonstraram a redução da qualidade do leite onde *Prototheca* spp. foi isolado (BRITTEN, 2012; HERTL et al., 2014). Entretanto, espécies de *Corynebacterium* spp. foram retratadas como patógenos secundários em decorrência às moderadas alterações na CCS (BRADLEY; GRENN, 2005; RADOSTITS et al., 2007; GONÇALVES, 2012).

No Brasil, *Staphylococcus* spp., seguidos por *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., são descritos como os principais micro-organismos associados a casos de mastite bovina (BRITO et al., 1999; MENDONÇA et al., 1999), contudo estudos mais recentes têm apontado uma alta prevalência de mastites causadas por *Corynebacterium* spp., sendo estas mais altas até mesmo do que mastites causadas por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (SOUTO et al., 2008; MARTINS et al., 2010).

Segundo estudo realizado por Laranja e Machado (1994), no Estado de São Paulo, os principais causadores de mastite foram *Staphylococcus* spp. (44,6%), seguidos por *Corynebacterium* spp. (15,0%), *Streptococcus* spp. (8,2%) e leveduras e fungos (5,4%). Estes dados se assemelham aos achados de Barbalho e Mota (2001) em estudo realizado no Estado de Pernambuco, no qual *Staphylococcus* spp. corresponderam a 38,76% do total de agentes isolados e *Corynebacterium* spp. foi isolado com frequência relativamente alta (27,91%). Assim como o estudo proposto por Ferreira et al. (2007) no Piauí, que também constou alta prevalência de *Staphylococcus* spp., correspondendo a cerca de 74,60% dos casos clínicos de mastite.

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias denominadas *Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos, catalase positivo, que se apresentam dispostos em cachos e que podem, ou não, possuir cápsula. São caracterizados, dentro da epidemiologia da mastite bovina, como um agente contagioso. Possuem poucas exigências nutricionais, crescendo na maioria dos meios bacteriológicos, em condições aeróbicas ou anaeróbicas. As colônias podem variar de coloração, desde acinzentadas até amarelo-ouro e podem apresentar formas circulares, lisas, elevadas ou brilhantes (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; PERINI, 2013).

Os *S. aureus* isolados de mastite bovina já são capazes de adquirir resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos, sendo algumas destas cepas resistentes a todos os produtos β -lactâmicos, incluindo a meticilina, sendo esta cepa conhecida como *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (MIMICA; MENDES, 2007; PERINI, 2013).

Dentre fatores potencialmente virulentos, destacam-se as proteínas de superfície com característica de promover a colonização de tecidos do hospedeiro; fatores de superfície que atuam inibindo a atividade fagocítica dos leucócitos; propriedades bioquímicas, como produção de catalase, favorecendo sua sobrevivência nos fagócitos; proteção contra a resposta imune; toxinas que promovem a lise de membranas de células eucariontes; exotoxinas que danificam os tecidos do hospedeiro; e um dos fatores mais importantes, a resistência inerente e adquirida aos agentes antimicrobianos (PEDRO; BRANCHINI, 1996).

Uma série de fatores de virulência agravam sua patogenicidade, contribuindo diretamente com a capacidade deste patógeno em causar danos ao hospedeiro. Além disto, podem produzir diversas enzimas que podem atuar contra o hospedeiro, tais como lipases, proteases, e hialuronidases. Dentre as principais enzimas produzidas pelo *S. aureus*, destaca-se a β -lactamase, que atua inativando as penicilinas, conferindo a este patógeno resistência às penicilinas e às cefalosporinas (PERINI, 2013).

A infecção por *S. aureus* em rebanhos leiteiros pode ser considerada a mais comum no Brasil e no mundo. Segundo Cruppe et al. (2008), a prevalência deste patógeno está em 32% das amostras de leite analisadas, outro fator determinante

para esta prevalência é que *S aureus* está relacionado a mastites de longa duração, causando grandes prejuízos ao produtor (ZECCONI, 2006; TAPONEN et al., 2009).

Estudos referentes ao impacto econômico da doença revelaram que as perdas em rebanhos onde foi detectada a presença de *S. aureus* foram maiores quando comparado a rebanhos onde o patógeno não foi encontrado (HALASA et al., 2007; REKSEN et al., 2007).

A espécie representa um dos patógenos mais importantes na bovinocultura leiteira, sendo que os principais reservatórios desta bactéria neste contexto produtivo são os quartos mamários infectados, a pele do úbere e os tetos (FONTANA et al., 2010). Além disto, representam grande problema de saúde pública, devido a possibilidade do leite apresentar contaminação por enterotoxinas termoestáveis, colocando em risco a saúde do consumidor (LOWY et al., 2000; DRESCHER et al., 2010).

2.1.2 *Streptococcus* spp.

As bactérias do gênero *Streptococcus* são classificadas como cocos gram-positivos, catalase negativos, frequentemente distribuídos aos pares ou em cadeias, podendo ser anaeróbios facultativos ou estritos (RUOFF; WHILEY; BEIGHTON, 2003). São micro-organismos nutricionalmente mais exigentes quando comparados ao *Staphylococcus* spp. Além disto, os estreptococos podem ser caracterizados quanto à sua capacidade de lisar hemácias em α -hemolíticos (hemólise parcial), β -hemolíticos (hemólise total) e γ -hemolíticos (não hemolíticos), dependendo do tipo de hemólise apresentada em ágar sangue (KILIAN, 1998; PERINI, 2013).

O gênero *Streptococcus* engloba, no mínimo, 50 espécies, sendo que vacas com mastite apresentam com maior frequência quatro espécies: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis* e *Streptococcus uberis*. Dentre elas, *S. agalactiae* possui maior prevalência dentre os isolamentos microbiológicos de quartos mamários infectados por este gênero. São considerados o segundo grupo de micro-organismos mais importante quanto etiologia da mastite em bovinos, atrás apenas dos estafilococos (INNINGS et al., 2005).

2.1.2.1 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae é caracterizado como um agente contagioso que apresenta características morfológicas e nutricionais similares ao gênero *Streptococcus* e, apesar de apresentar variabilidade nas características hemolíticas, a grande maioria das cepas caracteriza-se como β -hemolítica (KILIAN, 1998). De modo geral, o tratamento com antimicrobianos é bem sucedido, revelando susceptibilidade, principalmente, a antibióticos como ampicilina, enrofloxacin, gentamicina, neomicina e tetraciclina (COUTINHO et al., 2006).

Até a década de 80, *S. agalactiae* foi o patógeno mais prevalente isolado em rebanhos leiteiros (KEEFE, 1997), contudo, programas de controle baseados no emprego de antibióticos permitiu a erradicação deste agente em vários países, aumentando a prevalência de *S. aureus* (SOMMERHÄUSER et al., 2003). Segundo Erskine et al. (1996), infecções em todas as fases da lactação podem ter taxas de cura de 90-100% com penicilina, eritromicina, cloxacilina e cefalosporinas. Outros agentes antimicrobianos também podem ser usados, são eles as tetraciclina e cefalotina, contudo, gentamicina, neomicina e polimixina B não são recomendados para tratar infecções por *S. agalactiae* (WILSON et al., 1999).

2.1.2.2 *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae caracteriza-se como agente ambiental, sendo também comumente considerado um dos patógenos mais comuns da mastite bovina. São capazes de sobreviver na cavidade oral, vagina e em pele de animais saudáveis, bem como nas camas e pastagens (SEGURA; GOTTSCHALK, 2004).

É frequentemente isolado de novilhas e vacas no período seco e é um dos patógenos predominantes isolados em casos de mastites de verão. A disseminação de *S. dysgalactiae* entre vacas dentro de rebanhos leiteiros pode ocorrer diretamente ou por meio da ordenhadeira ou do ambiente (ALMEIDA; OLIVER, 1995).

S. dysgalactiae apresenta características de patógenos contagiosos e

ambientais sendo comumente categorizado como contagioso, embora seja principalmente um patógeno ambiental. Insetos, tais como moscas *Hydrotaea irritans*, também são descritos como vetores envolvidos na dispersão deste agente nos tetos de vacas (CHIRICO et al., 1997).

Em análises *in vitro*, a maioria dos isolados de *S. dysgalactiae* são suscetíveis à penicilina, novobicina, amoxicilina e cefapirina, além disto, cerca de 96% dos isolados também revelaram-se susceptíveis a tetraciclina. A maioria dos casos de mastite associada *S. dysgalactiae* responde bem a infusões intramamárias de penicilina, cefalosporinas, cloxacilina, eritromicina e tetraciclina (OLIVER et al., 2003; OLIVER et al., 2004).

2.1.3 *Corynebacterium bovis*

O gênero *Corynebacterium* compreende micro-organismos gram-positivos, que aparecem em formas cocóides, bacilos ou clavas. Grande maioria destas bactérias são catalase positiva, não formadoras de esporos, aeróbicas ou anaeróbicas facultativos que formam colônias não-hemolíticas e requerem meios enriquecidos para seu crescimento, podendo apresentar de coloração creme, cinza ou branco (QUINN et al., 2005).

Corynebacterium bovis é caracterizado como agente contagioso, podendo ser um invasor primário ou secundário de várias infecções piogênicas em ruminantes, suínos e ocasionalmente em equinos. No caso da mastite, é considerada uma bactéria moderadamente patogênica, ocorrendo rápida disseminação entre indivíduos (RADOSTITS et al., 2007). Ainda há um debate considerável sobre a importância deste agente na saúde da glândula mamária e na produção de leite e, por este motivo, *C. bovis* ainda é classificado como agente patogênico de menor importância (SARGEANT et al., 1998; RADOSTITS et al., 2007).

A glândula mamária e os dutos dos tetos são considerados o principal reservatório da infecção por *C. bovis*, podendo se espalhar rapidamente de vaca para vaca na ausência de pré-dipping. Além disso, por ser extremamente contagioso, a infecção intramamária é de longa duração, podendo perdurar por vários meses (RADOSTITS et al., 2007). A prevalência de *C. bovis* é geralmente

baixa em rebanhos que usam um agente germicida eficiente nos tetos, boa higiene de ordenha e terapia da vaca seca. Foi demonstrado, *in vivo*, que a bactéria tem uma predileção pelo canal do teto, sendo este resultado associado com uma exigência de lipídeos, possivelmente na camada de queratina, para seu crescimento. Outro fator interessante exaltado por Radostits et al. (2007), é que a glândula mamária que apresenta *C. bovis* tem menos probabilidade de infecção por *S. aureus*, uma vez que é possível que o *C. bovis* no canal do teto possa competir por nutrientes com bactérias ascendentes e, portanto, diminuir a taxa de infecção intramamária (BLACK; MARSHAL; BOURLAND, 1972; RADOSTITS et al., 2007).

Infecções intramamárias associadas com *C. bovis* são raramente associadas à doença clínica, mas geralmente provocam um aumento moderado na CCS e um pequeno aumento do CMT. Perdas na produção de leite geralmente são indetectáveis, apenas sendo observado um leite tipicamente mais grosso do que o normal e, ocasionalmente, os animais podem apresentar uma glândula firme e com aumento de volume (MORIN; CONSTABLE, 1998).

C. bovis é muito suscetível à penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefapirina, eritromicina e à maioria dos outros medicamentos intramamários disponíveis no mercado. A duração da infecção é prolongada em animais não tratados com os agentes antimicrobianos (BLACK; MARSHAL; BOURLAND, 1972; MORIN; CONSTABLE, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

2.1.4 *Prototheca zopfii*

Em relação à taxonomia, o gênero *Prototheca* tem sido muito discutido ao longo do tempo e foi classificado com Domínio *Eukaryota*, Reino *Viridiplante*, Filo *Chlorophyta*, Classe *Chlorophyceae*, Ordem *Chlorellales*, Família *Chlorellaceae* e Gênero *Prototheca* (RAPUNTEAN et al., 2009).

O gênero *Prototheca* é constituído por algas aclorofiladas e compreende cinco espécies: *P. moriformis*, *P. stagnora*, *P. ulmeas*, *P. wicherhamii* e *P. zopfii*. Estas algas, na natureza, são saprófitas e podem ser isoladas a partir de diferentes fontes ambientais com alta umidade e matéria orgânica, tais como solo, fontes de água e fezes. De distribuição cosmopolita, podem causar afecções em animais e inclusive

em seres humanos. Dentre elas, a *P. zopfii* é a principal alga associada à mastite bovina e caracterizada como agente ambiental (PORE, 1985; LASS-FLÖRL; MAYR, 2007; ZAINI et al., 2012).

Atualmente, a mastite causada por *Prototheca* spp. é uma infecção crônica, sem tratamentos eficazes, sendo, portanto necessária a utilização de antimicrobianos ou desinfetantes como forma de prevenção (SOBUKAWA et al., 2011). Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* revelaram grande resistência do perfil de susceptibilidade do gênero *Prototheca* aos antimicrobianos convencionais, antifúngicos e antissépticos (BUENO, MESQUITA; DIAS FILHO, 2006; BUZZINI et al., 2008).

Até a presente data, a única medida de controle tem sido a eliminação dos animais infectados, uma vez que a transmissão pode ocorrer por contato direto, se disseminando rapidamente por todo rebanho (ROESLER; HOLGER; HENSEL, 2001; MARQUES et al., 2006; HERTL et al., 2014). Além do mais, alguns princípios que se mostram eficazes no controle *in vitro* destes patógenos podem apresentar custo elevado, causar danos irreversíveis ao tecido secretor ou até mesmo não são disponibilizados para o uso veterinário (JÁNOSI et al., 2001).

2.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA

Os antibióticos são classificados como medicamentos desenvolvidos a partir de fungos, bactérias ou elementos sintéticos, com finalidade de eliminar ou impedir a multiplicação de micro-organismos (unicelulares ou pluricelulares) no hospedeiro, causando infecções. O uso destes medicamentos de forma contínua, indiscriminada ou sem orientação e acompanhamento de um profissional capacitado pode favorecer um processo de seleção nos micro-organismos alvo, resultando na seleção de linhagens resistentes ao princípio ativo empregado (TENOVER, 2006).

Desde a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, o homem trava uma disputa incansável contra os micro-organismos e sua capacidade de resistência aos medicamentos ao longo dos anos. Contudo, a previsão mostra-se extremamente desfavorável para os seres humanos e animais, acreditando-se que

esta já seja praticamente uma batalha perdida (GOODMAN; GILMAN, 1996; SUÁREZ et al., 2009).

A era dos antibióticos, iniciada anos após a descoberta da penicilina, foi marcada pelos grandes avanços terapêuticos frente a doenças que eram letais tanto aos seres humanos quanto aos animais. No entanto, o fenômeno de resistência bacteriana foi observado poucos anos após a descoberta dos antibióticos que, a princípio, não aparentava ser um problema tão grave, uma vez que, de modo geral, a seleção de cepas resistentes era facilmente resolvida com a introdução de novos antimicrobianos (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009). Em 1946, cerca de 5% de *S. aureus* isolados de pacientes hospitalares eram resistentes à penicilina, entretanto, três anos após, em 1949, esse número tinha subido para 29%. Em 1959, a resistência encontrava-se em 80% dos casos diagnosticados em hospitais americanos (BAUER; PERRY; KIRBY, 1960).

Os antibióticos atuam sobre uma série de processos celulares, os quais são essenciais para a sobrevivência dos micro-organismos, como alterações de processos metabólicos, alterações da parede celular, interferência na síntese de proteínas e bloqueio da síntese de DNA e RNA (TENOVER, 2006).

Basicamente, os antibióticos param de funcionar porque os micro-organismos desenvolvem mecanismos de defesas contra os princípios ativos empregados. Diversas bactérias desenvolvem a capacidade de impedir que um determinado antibiótico seja absorvido, para isto, conseguem alterar a permeabilidade de suas membranas. Outro mecanismo equivale ao uso de energia do ATP para remover os antibióticos para fora da célula microbiana. Outras bactérias, por sua vez, modificam a estrutura do alvo de modo que o fármaco não possa mais reconhecê-lo ou se ligar a ele. Há, ainda, mecanismos de destruição do princípio ativo por meio de enzimas produzidas pelos micro-organismos, como no caso das β -lactamases, enzimas que inativam a penicilina (LIM; WEBB, 2005).

Um micro-organismo é considerado resistente a determinado fármaco quando, *in vitro*, a concentração inibitória mínima (CIM) não é capaz de inibir o crescimento do mesmo, contudo, o conceito de micro-organismo multirresistente ainda é discutido. De forma geral, para um micro-organismo ser considerado multirresistente, o mesmo deve apresentar resistência a dois ou mais fármacos de classes distintas, para os quais os mesmos são originalmente sensíveis (COUTO, 2003).

Alguns micro-organismos podem ser considerados naturalmente resistentes a

uma ou mais classes de agentes antimicrobianos. Normalmente, isto ocorre por não apresentarem alvo molecular para ação do fármaco ou então por serem impermeáveis a eles, caracterizando, desta forma, a resistência primária. Por outro lado, a resistência secundária ou adquirida, ocorre devido a mutações ou por meio de aquisição de novo material genético transportado por elementos móveis, tais como transposons ou plasmídeos (LIM; WEBB, 2005).

Cepas multirresistentes de micro-organismos patogênicos vêm diminuindo a sobrevivência de pacientes, sendo descritas com frequência crescente por profissionais que militam na área da saúde. Atualmente, diversos estudos focam na importância da compreensão dos mecanismos de resistência para que se possa, portanto, adotar medidas preventivas (SUÁREZ et al., 2009).

Não muito diferente de outras áreas da saúde, pesquisadores vêm observando situações similares envolvendo o emprego de antibióticos no tratamento da mastite bovina e o aparecimento de cepas resistentes ou multirresistentes aos princípios ativos, aos quais, eram originalmente susceptíveis no passado (BOCHNIARZ; WAWRON, 2011; SILVEIRA-FILHO et al., 2014). O uso indiscriminado de antibióticos em animais de produção, como é o caso dos bovinos leiteiros, tem sido considerado catalisador do aumento de cepas resistentes a agentes antimicrobianos em isolados bacterianos, ocasionado não apenas problemas de saúde animal, mas também sendo alvo de debate por suas implicações na saúde humana (ERSKINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003).

Dentre os principais micro-organismos causadores da mastite estudados, *S. aureus* tem ganhado atenção especial. O crescimento na prevalência da mastite bovina causada por cepas de *S. aureus* multirresistentes é um fato extremamente relevante, principalmente em virtude da redução da efetividade dos antimicrobianos, aumento da morbidade no rebanho e dos prejuízos acarretados para debelar a doença (POL; RUEGG, 2007).

De forma geral, a sensibilidade ou a resistência de uma linhagem de determinado micro-organismo isolado frente a diferentes princípios ativos pode ser avaliada, *in vitro*, por meio do exame laboratorial denominado antibiograma. Além disto, este exame também pode auxiliar no diagnóstico da mastite identificando o agente etiológico e, portanto, auxiliando na eleição do controle e tratamento da doença. Quando instituído para auxiliar o diagnóstico da mastite, as possibilidades de cura tornam-se mais acuradas, principalmente em casos que não apresentam

melhora e sugerem problemas de resistência ao antimicrobiano administrado (OVERESCH; STEPHAN; PERRETEN, 2013).

Portanto, o conhecimento do perfil de susceptibilidade destes agentes patogênicos responsáveis pelo desenvolvimento da mastite em bovinos leiteiros é um ponto crítico na escolha do antimicrobiano a se adotar para o tratamento e controle da doença (ERSKINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003).

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A seguir, a terapia fotodinâmica será descrita em mais detalhes acerca de seu histórico a partir da descoberta de substâncias fotossensíveis que interagem com a luz, de dispositivos emissores de luz e das aplicações da PDT em diferentes perspectivas.

2.3.1 Histórico da Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade terapêutica baseada na ativação de substâncias fotossensibilizadoras pela luz, ocasionando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), com o objetivo de tratar enfermidades de origem microbiológica ou neoplásica. Sua aplicação vem sendo descrita no tratamento de neoplasias cutâneas (BAHNER; BORDEAUX, 2013; MROZ et al., 2013.) e na inativação de micro-organismos (EAGLESOME et al., 1994; JORI et al., 2011; PIRES et al., 2013).

Desde a antiguidade, o homem busca alternativas para debelar as diversas enfermidades que desafiam a vida. Desde o antigo Egito, compostos reativos com a luz são descritos para o tratamento de doenças de pele, de forma que documentos datados com cerca de seis mil anos de idade, mencionam o emprego de substâncias vegetais para produzir reações mediadas pela luz no tratamento de uma série de doenças. No Egito, Índia e China, a aplicação da luz solar era descrita para tratar

doenças da pele como psoríase, vitiligo e câncer, descritos a partir do papiro de Ebers (WEIS et al., 2012) e do livro sagrado indiano Atharva Veda (WYSS, 2000). Na Grécia antiga, relatos similares descritos pelo médico grego Heródoto recontavam a importância da exposição à luz para revigorar a saúde (ACKROYD et al., 2001).

No ano de 1900, surgiu o primeiro relato científico com o emprego da luz como tratamento fotodinâmico por Oscar Raab, um estudante de medicina e seu professor, Herman Von Tappeiner, em Munique. Ambos os pesquisadores investigavam a ação de um corante conhecido como acridina sobre culturas de paramécios e constataram que a associação deste corante com a luz foi letal para estes protozoários. Ao decorrer de uma tempestade e exposição a muitos raios, alterações das condições luminosas do ambiente no momento dos experimentos interferiram com a sobrevivência dos protozoários, apontando que o efeito observado era causado pela transferência de energia da luz para a substância química acridina, fato similar é descrito na absorção da luz pela clorofila em plantas. Posteriormente, a ação fotodinâmica foi fundamentada quando os autores observaram que a luz e o corante isoladamente não apresentaram qualquer efeito citotóxico aparente sobre a cultura de protozoários (ACKROYD et al., 2001).

Publicado em 1901 pelo o cientista dinamarquês Niels Finsen, o livro intitulado "Phototerapy", descrevia o emprego da luz no tratamento de seres humanos. Relatos descritos em seu livro demonstravam com sucesso a aplicação de filtros de luz sobre a pele no tratamento de pacientes portadores de *lupus vulgaris*. Poucos anos após, em 1903, o mesmo pesquisador foi contemplado com Prêmio Nobel na área de Medicina, por meio da PDT no tratamento de doença (PENG; MOAN; NESLAND, 1996; ALLISON et al., 2004).

No mesmo ano, o pesquisador alemão, Hereon Henrian von Tappeiner descobriu que a presença de oxigênio era necessária para desencadear resposta em tratamentos mediados pela luz, assim criando o termo "terapia fotodinâmica", ou mais comumente denominada como PDT, do inglês Photodynamic Therapy, aplicado até os dias atuais para descrever este procedimento (PENG; MOAN; NESLAND, 1996; ALLISON et al., 2004; BABILAS et al., 2005). Ainda em 1903, os pesquisadores Von Tappeiner e Jesionek investigaram o emprego do corante eosina e luz no tratamento de tumores de pele (DOUGHERTY et al., 1978; KESSEL, 2004).

Em 1908, houve uma grande evolução referente à aplicabilidade da PDT, quando os primeiros casos envolvendo o uso de porfirinas como agentes fotossensibilizadores foram descritos. Após dezesseis anos, em 1924, Policard detectou a emissão de fluorescência de tumores expostos a porfirina que eram irradiados, em seguida, com lâmpada de Wood. A partir de então, uma série de pesquisas foram desencadeadas por volta do final da década de 40, quando se descobriu que as porfirinas se concentravam preferencialmente em neoplasias (ACKROYD et al., 2001).

Em paralelo às diversas pesquisas que investigavam a aplicabilidade da PDT, Albert Einstein publicou, em 1916, uma teoria denominada “os princípios da luz pela emissão estimulada de radiação”, embasando os estudos que posteriormente culminaram no desenvolvimento, em 1960, por Theodore Maiman, do primeiro dispositivo batizado de Laser, uma abreviação de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, proporcionando, assim, o desenvolvimento de uma série de pesquisas envolvendo a interação luz e tecido a partir desta década (FELDMAN, 2009).

A compreensão das possíveis aplicações da PDT na oncologia foi acentuada por volta da década de 70, devido às pesquisas clínicas de Thomas Dougherty que envolviam o uso de derivados da hematoporfirina como o agente fotossensibilizador (FS), permitindo o desenvolvimento da formulação destas substâncias em larga escala e seguindo as normas estabelecidas pelo órgão regulador norte-americano Food and Drug Administration (FDA) (KESSEL, 2004). A partir da mesma década, relatos de efeitos de resistência microbiana aos antibióticos, observados anos após descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1928, instigaram um série de pesquisas que perduram até os dias atuais, investigando a PDT no controle de micro-organismos.

A origem da investigação da PDT em Medicina Veterinária iniciou-se em meados da década de 80, quando neoplasias de cães e gatos foram tratadas com derivados da hematoporfirina para, em seguida, serem irradiados por laser. Embora as pesquisas envolvessem um número limitado de animais e uma grande variedade de tipos tumorais, grande parte destes tumores respondeu aos protocolos estabelecidos (CHELI et al., 1984; LUCROY, 2002; EMILIO, 2008). Desde então, pesquisadores vêm se empenhando em desvendar as possíveis aplicações da PDT entre as diferentes espécies.

2.3.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da PDT baseia-se na interação de um agente FS, luz de comprimento específico e ressonante ao FS e oxigênio molecular, resultando na formação de EROS que, por sua vez, podem alterar estruturas fundamentais para a sobrevivência de micro-organismos sem que haja o desenvolvimento de resistência microbiana (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Na presença de oxigênio molecular, o FS ativado pode reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres por meio do mecanismo conhecido como *reação do tipo I* ou por transferência de energia diretamente ao oxigênio, mecanismo conhecido como *reação do tipo II*, levando à produção de oxigênio singlete. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente (HAMBLIN; HASAN, 2004; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; LAMBRECHTS; AALDERS; MARLE, 2005). O oxigênio singlete reage com quase todos os componentes celulares uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, suscetíveis à sua ação. Como a primeira barreira para o oxigênio singlete é a membrana celular e esta contém lipídios insaturados que serão danificados, ocorre a inviabilidade celular. Os hidroperóxidos resultantes podem levar à formação de EROS por meio de reações catalíticas. Uma vez que a reatividade das EROS com moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para PDT. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência celular, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização, além da morte celular (CARRÉ et al., 1999).

A fotossensibilização de bactérias está relacionada com a carga do FS, de modo que os que possuem carga neutra ou positiva interagem eficientemente e inativam bactérias Gram-positivas, ao passo que interagem em alguma extensão na membrana externa de bactérias Gram-negativas. A camada de peptidoglicano e ácido lipoteicoico na membrana externa de bactérias Gram-positivas permite a difusão do FS, entretanto, a membrana externa de bactérias Gram-negativas age como uma barreira física e funcional entre as células e o meio biológico (WAINWRIGHT et al., 1997; HAMBLIN; HASAN, 2004). Os fatores que determinarão

a morte seletiva de células do hospedeiro ou inativação microbiana estão diretamente relacionados com a molécula fotossensibilizante empregada e as dosimetrias química e luminosa (ALLISON et al., 2004; HAMBLIN; HASAN, 2004).

2.3.3 Terapia Fotodinâmica com fenotiazínicos

O FS pode ser considerado ideal quando apresentar baixa toxicidade após sua administração, não induzindo reação alérgica ou outros efeitos adversos no hospedeiro e, além disto, também deve ser puro, hidrossolúvel, facilmente sintetizado e ser eliminado rapidamente pelo organismo do hospedeiro (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Por fim, deve ser biologicamente estável, possuir alto rendimento quântico, ser seletivo para células alvo e ser minimamente tóxico aos tecidos normais (GARCEZ et al., 2003).

Dentre os principais FS pesquisados, destacam-se as fenotiazinas, como o azul de toluidina (AT) e o azul de metileno (AM). Em baixas concentrações, não produzem ação citotóxica e a dose necessária para a morte bacteriana é menor que a dose para causar danos às células, tais como os queratinócitos, fibroblastos (SOUKOS et al., 1996; HADDAD et al., 1999) e neutrófilos (TANAKA et al., 2012).

O AM é uma molécula conhecida há décadas como corante histológico e tem desempenhado papel importante nas áreas de microbiologia e farmacologia. Sua seletividade pela mitocôndria pode ser determinada por ser lipofílico e de carga positiva, atraído, portanto, devido ao ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial (GABRIELLI et al., 2004).

Em solução aquosa pode estar presente na forma de monômeros, dímeros e agregados maiores na forma de soluções de grandes concentrações, sendo estes distinguíveis pelas suas bandas de absorção, máximos em 664nm, 600nm e na região de 550nm, respectivamente (TARDIVO et al., 2005). Portanto, esta classe de FS(s) apresenta intensa reação em comprimentos de onda de 600 a 660nm, região do espectro vermelho da luz, tornando-o de grande vantagem por estar dentro da “janela foto-terapêutica” devido a eficiente penetração da luz em tecidos biológicos (STERNBERG; DOLPHIN, 1996; STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998).

Embora o intervalo de reação seja relativamente largo (600 a 660nm), seus picos de reação máxima se apresentam em dois pontos: 609nm e 668nm (BUDAVARI, 1996), variando, principalmente, em função do solvente empregado e da concentração do FS na solução (NÚÑEZ, 2007; SENA, 2013).

O AM é um composto fenotiazínico que se enquadra na categoria de desinfetante e antisséptico (ANVISA, 2013), apresentando massa molecular de 319,86 g/mol na forma anidra (sem água). Tem sido amplamente empregado como corante histológico, indicador de reações de oxirredução e como FS para PDT no tratamento de neoplasias e infecções (SENA, 2013). Além disto, na medicina, é recomendado como medicamento para tratar a metahemoglobinemia e como antídoto nas intoxicações por cianeto e nitrato (BUDAVARI, 1996).

Corantes fenotiazínicos tais como o AT e o AM já foram largamente investigados como FS tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas. Neste mecanismo de ação, as moléculas catiônicas primeiramente deslocam cátions bivalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) a partir de sua posição na membrana exterior, onde atuam como uma âncora para as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) carregadas negativamente. Nesta situação, a membrana se apresenta mais enfraquecida e, deste modo, se torna mais permeável ao FS catiônico, aumentando progressivamente a desorganização da barreira e a absorção do FS (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).

Diversos estudos observaram uma diferença fundamental de susceptibilidade à PDT entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. De forma geral, FS(s) neutros, aniônicos ou catiônicos inativam eficientemente bactérias Gram-positivas, contudo, apenas os FS(s) catiônicos (ou estratégias para tornar permeável a barreira bacteriana aos não catiônicos) eram eficazes contra espécies Gram-negativas. A diferença de susceptibilidade entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é justificada pelas características estruturais, uma vez que bactérias Gram-positivas possuem uma membrana citoplasmática porosa, composta por ácidos lipoproteicos e peptideoglicanos, possibilitando a penetração do FS. As bactérias Gram-negativas, por sua vez, possuem, além da membrana citoplasmática, outra membrana que é separada por peptideoglicanos contendo periplasma, formando uma barreira eficaz, restringindo a ligação e penetração de diversos componentes do FS (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Outro fator determinante é a seletividade destes FS(s) catiônicos por micro-organismos quando comparado às células do hospedeiro. Este fato ocorre devido ao processo de absorção das células microbianas ser mais rápido quando comparado às células do hospedeiro, uma vez que o processo de absorção das células do hospedeiro ocorre por endocitose. Deste modo, tratamentos com um curto período de irradiação tendem a causar danos mínimos às células do hospedeiro (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a PDT pode ser eficaz para inativar cepas dos seguintes patógenos causadores de mastite: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Prototheca zopfii*.

3.1.1 Objetivos específicos

- Determinar se a luz (LED vermelho, $\lambda=660\text{nm} \pm 15$, 320mW, 12,22J/cm²) e o azul de metileno (1mM), isoladamente, são citotóxicos para os patógenos avaliados;
- Determinar se as doses 5 segundos (0,50J/cm²), 10 segundos (1,01J/cm²), 30 segundos (3,05J/cm²), 1 minuto (6,11J/cm²) e 2 minutos (12,22J/cm²) de irradiação, são eficazes para inativar os patógenos avaliados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados no experimento encontram-se descritos a seguir.

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP, cepas dos seguintes patógenos isolados a partir de bovinos com mastite: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Prototheca zopfii*.

Em seguida, os micro-organismos acondicionados em placas de Petri com seus respectivos meios de cultura foram transportados ao Laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) para armazenamento.

Para o armazenamento dos patógenos, foi diluído glicerol em PBS na proporção de 1:10 e, em seguida, esta solução foi autoclavada a uma temperatura de 127⁰C com tempo de esterilização de 15 minutos. Os meios de cultura líquidos e frescos foram adicionados em tubos tipo Falcon (10mL) e posteriormente foram coletadas colônias isoladas com a alça estéril de microbiologia, previamente crescidas em meio sólido e semeadas nos tubos tipo Falcon com meio de cultura até o mesmo apresentar intensa turbidez. Os tubos tipo Falcon foram mantidos por volta de 30 minutos em estufa *shaker* a 37⁰C para que os micro-organismos voltassem a se desenvolver, entrando novamente na fase *log* de proliferação. A partir deste momento, foi retirado 60% do meio de cultura específico de cada patógeno e 40% do glicerol. Os micro-organismos foram, por final, devidamente identificados (cepa, espécie, data, responsável) e acondicionados em freezer à temperatura de -80⁰C.

Posteriormente, amostras da solução descongelada contendo os micro-organismos foram colhidas por meio de alça plástica e estéril e semeados em placas de Petri contendo solução de ágar sangue (500mL de água destilada + 26g de ágar

BHI + sangue ovino 5%), ágar BHI (500mL de água destilada + 26g de ágar Sabouraud) e ágar Sabouraud (500mL de água destilada + 32,5g de ágar Sabouraud), autoclavados a uma temperatura de 127⁰C durante 15 minutos para o desenvolvimento das colônias e mantidos em estufa bacteriológica com temperatura média em torno de 37⁰C.

Os tempos de crescimento de cada micro-organismo variaram de acordo com suas exigências e estão descritos abaixo no quadro 1.

Quadro 1 – Relação entre micro-organismo, meio de cultura e tempo de crescimento – São Paulo – 2014

Micro-organismo	Meio de cultura	Tempo de crescimento
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	16 - 24 horas
<i>Streptococcus agalactiae</i>	BHI	24 - 48 horas
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	BHI	24 - 48 horas
<i>Corynebacterium bovis</i>	sangue 5%	48 -72 horas
<i>Prototheca zopfii</i>	Sabouraud	16 - 24 horas

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.2 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

As estirpes bacterianas foram submetidas a testes de suscetibilidade *in vitro*, conduzidos no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Preventiva (VPS) e Zoonoses da FMVZ-USP, frente a diferentes antibióticos e quimioterápicos, a saber: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefalexina (30µg), cefalotina (30µg), cefepime (30µg), ceftiofur (30µg), ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg) (30µg), enrofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), norfloxacina (10µg), oxacilina (1µg), penicilina (10UI), sulfametoxazol+trimetoprin (25µg), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg).

Os testes foram realizados em meio de Muller & Hinton sendo que, nos casos de *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium bovis*, foram acrescidos 5% de sangue de

carneiro ao meio de cultura, empregando-se o método de disco difusão, segundo técnica de Bauer et al. (1966). A interpretação dos testes foi realizada pela medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento do micro-organismo. As concentrações, bem como o critério de interpretação, foram os recomendados pela Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).

4.3 FONTE DE LUZ

Como fonte de luz para a realização do experimento, foi utilizado aparelho de LED vermelho ($\lambda = 660\text{nm} \pm 15$), com potência de irradiação de 320mW, diâmetro de 2cm, irradiância de 100mw/cm², voltagem de 2.5/2.6 volts e corrente de 600 mA (Figura 1), pertencente ao Laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Figura 1 – Fonte de luz empregada no experimento (LED vermelho, $\lambda = 660\text{nm} \pm 15$, 320mW, diâmetro de 2cm, irradiância de 100mw/cm²) – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Os tempos de irradiação foram estipulados igualmente tanto para as bactérias quanto para *P. zopfii*, sendo empregados os tempos de 5 segundos (0,50J/cm²), 10 segundos (1,01J/cm²), 30 segundos (3,05J/cm²), 1 minuto (6,11J/cm²) e 2 minutos (12,22J/cm²) de irradiação.

A densidade de energia aplicada sobre os micro-organismos foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$DE = \frac{P \times t}{A} \Rightarrow t = \frac{DE \times A}{P}$$

Onde: DE = densidade de energia (J/cm²); P = potência (W) do aparelho; t= tempo (s); A = área de secção transversal do feixe de luz (cm²) do aparelho emissor.

Densidade de energia é a relação entre a energia administrada por um emissor de luz e a superfície de irradiação do feixe de luz. Refere-se à unidade de superfície irradiada e não à totalidade de energia emitida, podendo representar a dose de tratamento, assim como método de verificação da eficácia e referência da reprodutibilidade da terapia (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

4.4 FOTOSSENSIBILIZADOR

O fotossensibilizador empregado no experimento foi o azul de metileno (AM) na concentração de 1mM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), diluído em água destilada.

4.5 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Os inóculos foram preparados a partir de células dos micro-organismos cultivados em seus respectivos meios de cultura segundo a quadro 1. Posteriormente, foram suspensos em solução tamponada fosfatada estéril (PBS com

concentração final de NaCl 137mM, Fosfato 10mM, KCl 2,7mM e pH de 7,4) e homogeneizadas em agitador tipo vortex.

A concentração do inóculo foi estimada por meio da turbidez da suspensão. Inicialmente, para a amostra padrão, denominada *branco*, foram pipetados 3mL de solução PBS estéril em tubo de ensaio estéril. Esta amostra foi avaliada em espectrofotômetro emitindo $\lambda=540\text{nm}$ e ajustado com 100% de transmitância. Em seguida, as colônias dos micro-organismos crescidas em placa de Petri foram depositadas por meio de uma alça de plástico estéril no tubo de ensaio contendo 3mL de PBS estéril e homogeneizadas no agitador tipo vortex. A transmitância na suspensão de PBS estéril com os micro-organismos foi ajustada em $10 \pm 1\%$, que corresponde à concentração de 10^7 UFC/mL (Figura 2) (PFALLER et al., 1988).

Figura 2 – Transmitância na suspensão de PBS estéril com os micro-organismos em $10 \pm 1\%$, correspondente à concentração de 10^7 UFC/mL – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Após esta etapa, foram dispostos dentro de câmara de fluxo oito tubos do tipo *ependorf* para as amostras bacterianas e de *P. zopfii*, caracterizando, desta forma,

os grupos avaliados: controle (C), luz – LED vermelho (L), AM (azul de metileno), PDT 5s, PDT 10s, PDT 30s, PDT 1min e PDT 2min para as bactérias e *P. zopfi*, como sendo os grupos de irradiação. Em seguida, foram dispostos nos referidos tubos 720µL de PBS estéril + 40µL do inóculo (previamente homogeneizado) (Figura 3).

Figura 3 – Preparação dos inóculos nos oito grupos avaliados – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.6 PREPARO DA DILUIÇÃO DAS BACTÉRIAS

Em uma placa de Wells, foram pipetados 180µL de PBS estéril em todos os grupos (colunas) a partir da diluição 1. Na diluição 0, foram pipetados 180µL de PBS estéril somente para os grupos C, L e AM (Quadro 2).

Quadro 2 – Preparo da diluição das amostras bacterianas em placa de Wells. C=controle; L=LED vermelho 660nm; MB= Azul de metileno; 5s, 10s, 30s, 1' e 2' = grupos PDT de tempos de irradiação – São Paulo – 2014

Diluições	Grupos			Grupos PDT				
	C	L	AM	5s	10s	30s	1'	2'
0	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS					
1	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
2	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
3	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
4	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
5	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
6	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
7	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.7 PREPARO DA DILUIÇÃO DE *Prototheca zopfii*

Em uma placa de Wells, foram pipetados 180µL de PBS estéril em todas as colunas a partir da diluição 1 e, diferentemente do Quadro 1, na diluição 0 dos grupos C, L e AM não foram adicionados 180µL de PBS estéril (Quadro 3).

Quadro 3 – Preparo da diluição das amostras de *P. zopffii* em placa de Wells. C=controle; L=LED vermelho 660nm; MB= Azul de metileno; 5s, 10s, 30s, 1' e 2' = grupos PDT de tempos de irradiação – São Paulo – 2014

Diluições	Grupos			Grupos PDT				
	C	L	AM	5s	10s	30s	1'	2'
0								
1	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
2	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
3	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
4	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
5	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
6	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
7	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.8 PREPARO DAS AMOSTRAS

A seguir, será descrito o método de preparo das amostras a serem avaliadas durante o experimento.

4.8.1 Grupos C, L e AM - Bactérias

Para os grupos C e L das bactérias, foram pipetados 40µL de PBS estéril e adicionados nos tubos tipo *ependorf* dos respectivos grupos, os quais já continham, como descrito anteriormente, 720µL de PBS estéril + 40µL do inóculo, para, em seguida, serem homogeneizados em agitador tipo vortex, caracterizando, portanto, uma amostra final contendo 800 µL.

Para os grupos C, a partir da amostra final, foram pipetados 20µL desta solução e acondicionados nas diluições “0” da placa de Wells para os grupos C, a qual, por sua vez, já continham 180µL de PBS estéril.

Para os grupos L, foi retirada, após homogeneização, alíquota de 400µL para ser acondicionada em poços de placa para cultura de células (24 poços). Após esta etapa, procedeu-se a irradiação do poço com o tempo de dois minutos para as bactérias. Após o período de irradiação, foram pipetadas amostras de 20µL e adicionadas então nas diluições “0” dos grupos L.

Nos grupos AM, foram pipetados 40µL de azul de metileno (1mM) e adicionados no tubo tipo *ependorf* do respectivo grupo (contendo 720µL de PBS estéril + 40µL do inóculo). Após cinco minutos, as amostras foram homogeneizadas para então serem pipetados 20µL da solução e acondicionados nas diluições “0” dos grupos AM.

A sequência acima pode ser melhor ilustrada nas figuras 4, 5 e 6.

Figura 4 – Sequência do preparo das amostras bacterianas dos grupos C – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 5 – Sequência do preparo das amostras bacterianas dos grupos L – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 6 – Sequência do preparo das amostras bacterianas dos grupos AM – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.8.2 Grupos C, L e AM - *Prototheca zopfii*

Para os grupos C e L, foram pipetados 40µL de PBS estéril e adicionados nos tubos tipo *ependorf* dos grupos C e L, os quais já continham, como descrito anteriormente, 720µL de PBS estéril + 40µL do inóculo, para, em seguida, serem homogeneizados por meio de pipetagem caracterizando, deste modo, a amostra final contendo 800µL. A homogeneização por meio da pipetagem foi necessária em decorrência da grande adesão de colônias ao tubo de ensaio quando homogeneizadas em agitador tipo vortex.

Para os grupos C, a partir da amostra final, foram pipetados 200µL desta solução e acondicionados na diluição 0 da placa de Wells para o grupo C.

Para os grupos L, foi retirada, após homogeneização, alíquota de 400µL para ser acondicionada em poços de placa para cultura de células (24 poços). Após esta etapa, procedeu-se a irradiação do poço com o tempo de dois minutos. Após o período de irradiação, foi pipetada amostra de 200µL e adicionada então na diluição 0 do grupo L.

No grupo AM, foram pipetados 40µL de azul de metileno (1mM) e adicionados no tubo tipo *ependorf* do respectivo grupo (contendo 720µL de PBS estéril + 40µL do inóculo). Após cinco minutos, a amostra foi homogeneizada para então serem pipetados 200µL da solução resultante e acondicionados na diluição 0 do grupo AM.

A sequência acima pode ser melhor ilustrada nas figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 – Sequência do preparo das amostras de *P. zopfi* do grupo C – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 8 – Sequência do preparo das amostras de *P. zopfi* do grupo L – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 9 – Sequência do preparo das amostras de *P. zopfii* do grupo AM – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.8.3 Grupos PDT – Bactérias e *Prototheca zopfii*

Foram pipetados 40µL de azul de metileno para cada grupo tratado com PDT e após cinco minutos de pré-irradiação, 400µL foram depositados nos respectivos poços da placa de 24 poços e em seguida irradiados com seus respectivos tempos. Após a irradiação dos grupos, amostras de 200µL foram adicionadas nas diluições “0” dos respectivos grupos (Figura 10).

Figura 10 – Sequência do preparo das amostras bacterianas e de *P. zopfi* dos grupos PDT – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.9 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Com uma pipeta multicanal, foram pipetados 20µL do volume inicialmente disposto nos poços das diluições “0” da placa de Wells e, então, diluídos nos poços das diluições imediatamente abaixo, todos contendo 180µL de PBS estéril a partir da diluição 1, formando um volume final de 200µL de suspensão. A diluição ocorreu da diluição 0 para a diluição 1 e assim sucessivamente, em todos os grupos experimentais (Figuras 11 e 12). Portanto, a cada diluição da suspensão, a fração de suspensão resultante era 10 vezes menor do que a anterior, sendo, desta forma, a última diluição (diluição 7) correspondente a uma amostra de suspensão com um volume 10^{-7} menor que a primeira (diluição 0). Considerando que as amostras das suspensões de bactérias estavam inicialmente 10 vezes mais diluídas do que as amostras de suspensão de *P. zopfii*, isto é, 20µL (+180 µL de PBS) contra 200µL (+0µL de PBS), respectivamente, na diluição 0 da placa de Wells, temos que, ao final (diluição 7), as amostras de suspensão das bactérias encontravam-se 10^8 mais diluídas em relação a amostra inicial, enquanto que as amostras de *P. zopfii* encontravam-se diluídas 10^7 vezes em relação à amostra inicial (diluição 0).

Figura 11 – Diluição das amostras em placa de Wells – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 12 – Diluição das amostras em placa de Wells (C= controle, L= LED vermelho 660nm, AM= azul de metileno, 5s, 10s, 30s, 1' e 2'= grupos irradiados) – São Paulo – 2014

Diluições	Grupos			Grupos PDT				
	C	L	AM	5s	10s	30s	1'	2'
0	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
1	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
2	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
3	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
4	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
5	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
6	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS
7	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS	180 µL PBS

X
 $20\mu\text{L} = x \cdot 10^{-1}$
 $20\mu\text{L} = x \cdot 10^{-2}$
 $20\mu\text{L} = x \cdot 10^{-3}$
 $20\mu\text{L} = x \cdot 10^{-4}$
 $20\mu\text{L} = x \cdot 10^{-5}$
 $20\mu\text{L} = x \cdot 10^{-6}$
 $20\mu\text{L} = x \cdot 10^{-7}$

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.10 CONTAGEM DE COLÔNIAS

A seguir, serão descritos os métodos para contagem das colônias de bactérias e de *Prototheca zopfii*

4.10.1 Grupos C, L e AM (Bactérias)

Com uma pipeta multicanal, foram retiradas alíquotas de 10µL, previamente homogeneizadas, de cada diluição dos grupos C, L e AM, sendo retirado este volume, individualmente, da diluição 2 até a diluição 7 da placa de Wells para os referidos grupos (Figura 13). Posteriormente, estas amostras foram semeadas em forma de estria, de acordo com a metodologia de Jett et al.(1997), em triplicata, em placas de Petri com seus respectivos meios de cultura descritos na Tabela 1. Ao se realizar a semeadura, não houve mistura das gotas durante o escorrimento para esgotamento das mesmas na placa de Petri, possibilitando, assim, a contagem das colônias de acordo com o proposto por Jett et al. (1997).

Figura 13 – Diluições selecionadas para serem semeadas das amostras bacterianas dos Grupos C, L e AM – São Paulo – 2014

Diluições	Grupos			Grupos PDT				
	C	L	AM	5s	10s	30s	1'	2'
0								
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.10.2 Grupos C, L e AM (*Prototheca zopfii*)

Com uma pipeta multicanal, foram retiradas alíquotas de 10µL, previamente homogeneizadas, de cada diluição dos grupos C, L e AM, sendo retirado este volume, individualmente, da diluição 0 até a diluição 5 da placa de Wells para os referidos grupos (Figura 14). Posteriormente, estas amostras foram semeadas em forma de estria, de acordo com a metodologia de Jett et al. (1997), em triplicata, em placas de Petri com seus respectivos meios de cultura descritos na tabela 1. Ao se realizar a semeadura, não houve mistura das gotas durante o escorrimento para esgotamento das mesmas na placa de Petri, possibilitando assim a contagem das colônias de acordo com o proposto por Jett et al. (1997).

Figura 14 – Diluições selecionadas para serem semeadas das amostras de *P. zopfii* dos Grupos C, L e AM – São Paulo – 2014

Diluições	Grupos			Grupos PDT				
	C	L	AM	5s	10s	30s	1'	2'
0								
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.10.3 Grupos PDT (*Bactérias e Prototheca zopfii*)

Nos grupos PDT (5s, 10s, 30s, 1'e 2'), o protocolo foi mantido, sendo pipetado volume idêntico (10µL) aos grupos anteriores. Contudo, as amostras foram

colhidas individualmente da diluição 0 até a diluição 6 de cada grupo na placa de Wells (Figura 15).

Da mesma forma, as amostras foram semeadas de acordo com a mesma técnica (JETT et al., 1997) e foram realizadas em triplicata para evitar erros na contagem das colônias e para que houvesse acurácia na análise estatística a ser desenvolvida.

Figura 15 – Diluições selecionadas para serem semeadas das amostras bacterianas e de *P. zopfii* dos Grupos PDT – São Paulo – 2014

Diluições	Grupos			Grupos PDT				
	C	L	AM	5s	10s	30s	1min	2min
0								
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								

Fonte: (SELLERA, 2014)

4.10.4 Tempo de incubação para contagem

O tempo de incubação para contagem de colônias foi realizado conforme a Tabela 1. A contagem das colônias foi realizada por meio da marcação correspondente, com caneta na parte posterior das placas de Petri, das colônias crescidas em suas respectivas diluições, após o respectivo tempo de crescimento (Quadro 1), sendo o valor adotado para contagem entre 10 e 100 colônias por gota, de acordo com o proposto por Jett et al. (1997). Ao final da marcação, o número total de colônias marcadas era contado e registrado (Figura 16).

Figura 16 - Ilustração das UFC/mL semeadas em forma de estria – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, os valores das UFC sofreram transformação logarítmica por meio da fórmula $LVAR = \log(\text{var}+1)$. A média e o erro padrão foram calculados utilizando o procedimento Means do SAS versão 9.0 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os testes de normalidade dos resíduos foram realizados utilizando-se o Teste Shapiro-Wilk e para homogeneidade das variâncias utilizou-se o Teste de Levene. Dados que não respeitaram as premissas para a análise de variância, isto é, distribuição normal e homogeneidade das variâncias, foram transformados em conformidade e novamente analisados.

Nas variáveis nas quais foram satisfeitas as premissas de distribuição normal e a hipótese de homogeneidade, utilizou-se a análise de variância para testar igualdade de médias. O modelo experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Nos casos em que houve significância na análise de variância, para a separação das médias optou-se por utilizar o teste paramétrico de Scheffé, com nível de 5% de significância ($p < 0,05$), conforme recomenda Sampaio (1998).

Para as variáveis nas quais a suposição de normalidade dos resíduos ou homogeneidade das variâncias não foi satisfeita, optou-se por utilizar os testes não paramétricos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação entre os grupos experimentais (SAMPALIO, 1998).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serão descritos abaixo os resultados encontrados nos testes de suscetibilidade *in vitro* (antibiograma) para *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. aureus* e *C. bovis*, assim como os resultados obtidos referentes à fotoinativação de *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *C. bovis* e *P. zopfii*. Os resultados estão expostos descritivamente e também em forma de tabela (Tabela 1) e gráficos (Gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). A discussão dos resultados encontrados será apresentada em seguida à descrição dos resultados.

6.1 ANTIBIOGRAMA

De acordo com os resultados obtidos, *S. dysgalactiae* apresentou resistência a sete dos 19 princípios ativos testados: amicacina, ampicilina, cefepime, gentamicina, neomicina, oxacilina e penicilina (Quadro 4). De forma similar, *S. agalactiae* apresentou resistência a oito dos 19 princípios ativos testados: amicacina, ampicilina, cefepime, gentamicina, neomicina, oxacilina, penicilina e sulfa com trimetoprim (Quadro 5).

Com a menor resistência encontrada, temos *S. aureus* apresentando resistência em três dos 19 princípios ativos testados: ampicilina, cefepime e penicilina (Quadro 6), enquanto que *C. bovis* apresentou resistência em quatro dos 19 princípios ativos testados: ampicilina, cefepime, oxacilina e penicilina (Quadro 7).

A seguir, serão apresentados em forma de quadros os resultados referentes aos testes de suscetibilidade *in vitro* para *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. aureus* e *C. bovis*.

Apesar do objetivo deste trabalho não ser a discussão em torno da multirresistência de alguns patógenos quando submetidos a testes de suscetibilidade, deve ser ressaltado que à medida que estes micro-organismos se apresentam, atualmente, como um desafio aos tratamentos tradicionais baseados no emprego de drogas antimicrobianas, o mesmo não acontece frente ao emprego da PDT, uma vez que, segundo Hamblin e Hasan (2004), a multirresistência não

determina menor suscetibilidade dos micro-organismos multirresistentes perante a fotoinativação.

Quadro 4 – Resultado dos testes de suscetibilidade *in vitro* para *S. dysgalactiae* frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014

<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
Princípio Ativo	Resultado
Amicacina	R
Ampicilina	R
Cefalexina	S
Cefalotina	S
Cefepime	R
Ceftiofur	S
Ciprofloxacina	I
Clindamicina	S
Cloranfenicol	S
Enrofloxacina	I
Eritromicina	S
Gentamicina	R
Neomicina	R
Norfloxacina	S
Oxacilina	R
Penicilina	R
Sulfa + Trimetoprim	I
Tetraciclina	S
Vancomicina	S

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: R= Resistente, I = Intermediário, S = Sensível.

Quadro 5 – Resultado dos testes de suscetibilidade *in vitro* para *S. agalactiae* frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014

<i>Streptococcus agalactiae</i>	
Princípio Ativo	Resultado
Amicacina	R
Ampicilina	R
Cefalexina	S
Cefalotina	S
Cefepime	R
Ceftiofur	S
Ciprofloxacina	I
Clindamicina	S
Cloranfenicol	S
Enrofloxacina	S
Eritromicina	S
Gentamicina	R
Neomicina	R
Norfloxacina	S
Oxacilina	R
Penicilina	R
Sulfa + Trimetoprim	R
Tetraciclina	I
Vancomicina	S

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: R= Resistente, I = Intermediário, S = Sensível.

Quadro 6 – Resultado dos testes de suscetibilidade *in vitro* para *S. aureus* frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Princípio Ativo	Resultado
Amicacina	S
Ampicilina	R
Cefalexina	S
Cefalotina	S
Cefepime	R
Ceftiofur	S
Ciprofloxacina	S
Clindamicina	S
Cloranfenicol	S
Enrofloxacina	S
Eritromicina	S
Gentamicina	S
Neomicina	S
Norfloxacina	S
Oxacilina	I
Penicilina	R
Sulfa + Trimetoprim	S
Tetraciclina	I
Vancomicina	S

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: R= Resistente, I = Intermediário, S = Sensível.

Quadro 7 – Resultado dos testes de suscetibilidade *in vitro* para *C.bovis* frente a diferentes antimicrobianos – São Paulo – 2014

<i>Corynebacterium bovis</i>	
Princípio Ativo	Resultado
Amicacina	S
Ampicilina	R
Cefalexina	S
Cefalotina	S
Cefepime	R
Ceftiofur	S
Ciprofloxacina	S
Clindamicina	S
Cloranfenicol	S
Enrofloxacina	S
Eritromicina	S
Gentamicina	S
Neomicina	S
Norfloxacina	S
Oxacilina	R
Penicilina	R
Sulfa + Trimetoprim	S
Tetraciclina	S
Vancomicina	S

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: R= Resistente, I = Intermediário, S = Sensível.

6.2 FOTOINATIVAÇÃO

Os resultados gerais referentes à fotoinativação estão apresentados na tabela 1 e gráfico 1. Os resultados individuais da fotoinativação estão apresentados nos gráficos 1 a 7

Para os grupos C, Luz e AM, de forma geral, nem a irradiação com o LED, nem o corante não irradiado na presença da suspensão de micro-organismos mostrou qualquer efeito deletério ao crescimento das diferentes espécies (Tabela 1 e Gráfico 1).

Em relação ao grupo C, referente ao controle, não foram observadas diminuições significativas em nenhum dos cinco patógenos avaliados, atestando que as células permaneceram viáveis (Figura 17, Tabela 1 e Gráfico 1).

Figura 17 – Placa de Petri apresentando colônias de *S. dysgalactiae* semeadas a partir de diferentes diluições do grupo Controle – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Resultado semelhante também foi observado nos grupos AM. A presença deste FS isoladamente na suspensão apresentou redução estatística significativa no crescimento de *S. dysgalactiae* (Tabela 1, Gráfico 1 e 3), ainda que, numericamente, a redução tenha sido muito baixa.

Tal fato aponta que não houveram efeitos citotóxicos notáveis causados pela ação isolada do AM na concentração de 1mM nas cepas de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *C. bovis* e *Prototheca zopfii* avaliadas (Figura 18, Tabela 1 e Gráfico 1).

Figura 18 – Placa de Petri apresentando colônias de *S. dysgalactiae* semeadas a partir de diferentes diluições do grupo AM – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Estes achados corroboram com estudos que avaliaram os efeitos isolados do AM contra cepas de *S. aureus*. Segundo Zanin et al. (2006) e Hajim, Salih e Rassam (2010), não foram observados efeitos do emprego isolado do AM, em concentrações próximas ao do presente estudo, contra *S. aureus*. Além disto, efeitos similares foram observados em outros experimentos realizados com diferentes bactérias e fungos (SILVA GARCEZ et al., 2006; PRATES et al., 2010). Entretanto, alguns autores, como Dobson e Wilson (1992) e Silbert et al. (2000), demonstraram que os FS, AM e AT podem, isoladamente, apresentar efeitos citotóxicos para algumas culturas de bactérias em decorrência da concentração utilizada, ao contrário dos resultados encontrados no presente estudo.

Nos grupos Luz, expostos exclusivamente à irradiação com o LED, do mesmo modo, não foram observados efeitos citotóxicos perceptíveis nas colônias dos cinco patógenos abordados (Figura 19, Tabela 1 e Gráfico 1).

Figura 19 – Placa de Petri apresentando colônias de *S. dysgalactiae* semeadas a partir de diferentes diluições do grupo L – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Outros estudos também demonstraram que a luz emitida isoladamente, em parâmetros próximos ao do presente experimento, não apresentaram ação citotóxica contra micro-organismos (PRATES et al., 2007, 2010). Os resultados encontrados reforçam o conceito de que a interação entre FS, luz de comprimento de onda específico e a disponibilidade de oxigênio molecular são fundamentais para o sucesso da PDT.

Em estudos clínicos, é conhecido o fato de que a luz, isoladamente, pode propiciar efeitos biomoduladores (ROMANOS; NENTWIG, 1999). Estudos descritos principalmente na Odontologia ao longo dos anos demonstraram esses efeitos sobre tecidos glandulares, resultando no aumento da quantidade de secreções liberadas pelas glândulas salivares (SIMÕES et al., 2009; LONČAR et al., 2011). Estes efeitos descritos tornam-se outro fato a ser explorado em futuros estudos *in vivo*, não sobre a inativação de patógenos, mas, principalmente, em relação a possíveis alterações na produção de leite da glândula mamária tratada.

Nos últimos anos, a PDT tornou-se uma nova modalidade terapêutica emergente para infecções microbianas localizadas. Embora o efeito antimicrobiano da PDT tenha sido descoberto já em 1900, o potencial da PDT não foi explorado por várias décadas, devido à descoberta e desenvolvimento de antibióticos (JORI et al., 2006). No entanto, devido ao surgimento de múltiplos micro-organismos resistentes na década de 1980 em consequência do uso inadequado ou excessivo de

antibióticos, a PDT tem atraído consideravelmente a atenção como uma possível abordagem alternativa (MARTINETTO et al., 1986; JORI et al., 2006).

Por meio desta eficaz abordagem alternativa, foi realizado este experimento investigando o efeito da aplicação da PDT em diferentes patógenos causadores da mastite bovina e, ao contrário dos grupos Controle, Luz e AM, foi possível constatar a redução significativa no número de UFC nos grupos expostos à PDT, apresentando número decrescente no desenvolvimento microbiano de acordo com o aumento gradual de exposição dos micro-organismos à PDT, mostrando-se, desta forma, sensíveis à terapia proposta, (Figuras 20 a 24 e Gráficos 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

De forma geral, as bactérias submetidas à PDT demonstraram que a densidade de energia a partir de $0,5\text{J}/\text{cm}^2$ (5 segundos de irradiação) começou a apresentar inativação significativa quando comparada aos grupos C, Luz e AM (Figuras 20 a 24, Tabela 1 e Gráficos 1, 2, 3, 4 e 5).

Entretanto, *P. zopfii*, no grupo PDT, somente apresentou inativação moderada a partir da densidade de energia $1,01\text{J}/\text{cm}^2$ (10 segundos de irradiação) quando comparada aos grupos C, Luz e AM (Tabela 1 e Gráficos 1 e 6), demonstrando ser mais resistente à inativação quando comparada com *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *C. bovis*.

Nos grupos PDT, após 5 segundos de irradiação sob $0,50\text{ J}/\text{cm}^2$, houve redução na fração de sobrevivência (Gráfico 7) de mais de 1 log para *S. aureus* e menos do que 1 log para *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *C. bovis* e *P. zopfii*.

Sob $1,01\text{ J}/\text{cm}^2$, isto é, 10 segundos de irradiação, a fração de sobrevivência (Gráfico 7) foi reduzida em mais de 2 logs para *S. aureus*, mais do que 1 log para *S. dysgalactiae* e *S. agalactiae*, mais do que 3 logs para *C. bovis* e menos do que 1 log para *P. zopfii*.

A fração de sobrevivência (Gráfico 7) com 30 segundos de irradiação sob $3,05\text{ J}/\text{cm}^2$ reduziu 7 logs para *S. aureus*, *S. dysgalactiae* e *C. bovis*, isto é, determinando a completa inativação dos patógenos a partir desta densidade de energia. Entretanto, *S. agalactiae* e *P. zopfii* ainda apresentavam resistência à citotoxicidade da PDT, reduzindo mais do que 1 log e menos do que 1 log, respectivamente.

A PDT com 1 minuto de irradiação sob $6,11\text{ J}/\text{cm}^2$ determinou redução na fração de sobrevivência de mais de 3 logs para *S. agalactiae* e menos de 1 log para *P. zopfii* (Gráfico 7), demonstrando, portanto, a maior resistência deste último frente

à aplicação de PDT quando comparada com as bactérias.

Foi possível constatar que houve, após 2 minutos de irradiação, redução de 7 logs sob $12,22\text{J}/\text{cm}^2$ para todos os patógenos estudados, demonstrando que esta densidade de energia apresentou citotoxicidade eficaz para inativar os patógenos mais resistentes do presente estudo (Gráfico 7).

De acordo com os resultados encontrados, foi possível constatar que as bactérias *S. aureus*, *S. dysgalactiae* e *C. bovis* apresentaram comportamentos semelhantes na resposta à PDT, obtendo 100% de inativação a partir de 30 segundos de irradiação, totalizando $3,05\text{J}/\text{cm}^2$ (Tabela 1 e Gráficos 1, 2, 3 e 5). Entretanto, de forma contrária aos demais patógenos bacterianos, *S. agalactiae* exibiu comportamento semelhante ao patógeno *P. zopfii*, sendo completamente inativado a partir de 2 minutos de irradiação, totalizando $12,22\text{J}/\text{cm}^2$ (Tabela 1 e Gráficos 1, 4 e 6).

O patógeno *S. agalactiae* apresentou a maior resistência nos testes de suscetibilidade *in vitro* em relação às demais bactérias estudadas (Quadro 4). Estudos que avaliaram a fotoinativação de micro-organismos multirresistentes demonstraram que estes são tão susceptíveis quanto cepas semelhantes menos patogênicas (HAMBLIN; HASAN, 2004). Contudo, *S. agalactiae* demonstrou maior resistência no antibiograma e também maior resistência em relação à densidade de energia empregada para a total inativação quando comparado com as outras bactérias deste estudo. Portanto, a correlação de elevada resistência no antibiograma e elevada resistência na fotoinativação merece ser melhor investigada em virtude dos resultados encontrados.

Deste modo, de acordo com os resultados encontrados, foi possível concluir que os efeitos da inativação foram proporcionais ao tempo de irradiação (Figuras 20, 21, 22, 23, 24 e Gráfico 1).

Figura 20 – Placa de Petri apresentando colônias de *S. dysgalactiae* semeadas a partir de diferentes diluições do grupo PDT 5s – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 21 – Placa de Petri apresentando colônias de *S. dysgalactiae* semeadas a partir de diferentes diluições do grupo PDT 10s – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 22 – Placa de Petri não apresentando colônias de *S. dysgalactiae* semeadas a partir de diferentes diluições do grupo PDT 30s – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 23 – Placa de Petri não apresentando crescimento de *S. dysgalactiae* semeados a partir de diferentes diluições do grupo PDT 1min – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Figura 24 – Placa de Petri não apresentando crescimento de *S. dysgalactiae* semeados a partir de diferentes diluições do grupo PDT 2min – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Tabela 1 – Resultados (média ± erro padrão) do logaritmo da UFC/mL, segundo o micro-organismo e o tratamento aplicado – São Paulo – 2014

M.O.	CONTROLE	TRATAMENTOS							p
		LUZ	A.M.	PDT 5s	PDT 10s	PDT 30s	PDT 1min	PDT 2min	
<i>S. aureus</i>	17,05 ± 0,05 ^A	16,82 ± 0,07 ^A	16,8 ± 0,08 ^A	13,64 ± 0,04 ^B	11,2 ± 0,01 ^C	0 ^D	0 ^D	0 ^D	= 0,0022*
<i>S. dysgalactiae</i>	15,69 ± 0,04 ^A	15,67 ± 0,06 ^A	15,22 ± 0,12 ^B	14 ± 0,08 ^C	11,5 ± 0,09 ^D	0 ^E	0 ^E	0 ^E	= 0,0021*
<i>S. agalactiae</i>	14,4 ± 0,10 ^a	14,26 ± 0,13 ^a	14,14 ± 0,16 ^a	13,04 ± 0,10 ^b	11,75 ± 0,15 ^c	11,20 ± 0,12 ^c	6,44 ± 0,23 ^d	0 ^e	< 0,001*
<i>C. bovis</i>	13,4 ± 0,05 ^A	14,2 ± 0,01 ^B	13,5 ± 0,09 ^A	11,43 ± 0,02 ^C	5,57 ± 0,13 ^D	0 ^E	0 ^E	0 ^E	= 0,0021*
<i>P. zopfii</i>	8,6 ± 0,05 ^a	8,64 ± 0,05 ^a	8,72 ± 0,07 ^a	8,47 ± 0,08 ^b	8,03 ± 0,06 ^c	8,0 ± 0,04 ^d	7,27 ± 0,1 ^d	0 ^e	< 0,001*

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: UFC: Unidades formadoras de colônias; M.O.: micro-organismo; AM: azul de metileno

a, b, c, d, e: letras iguais na mesma linha denotam ausência de diferença estatística significativa - Teste de Scheffé (p<0,05)

A, B, C, D, E: letras iguais na mesma linha denotam ausência de diferença estatística significativa – Teste de Kruskal-Wallis (p<0,05)

Gráfico 1 – Médias (UFC/mL) resultantes após os diferentes tratamentos aplicados – Controle, Luz, Azul de metileno, PDT 5s, PDT 10s, PDT 30s, PDT 1min e PDT 2min – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Gráfico 2 – Médias, em UFC/mL, de *Staphylococcus aureus* de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: A, B, C, D: letras iguais denotam ausência de diferença estatística significativa - Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,0022$)

Gráfico 3 – Médias, em UFC/mL, de *Streptococcus dysgalactiae* de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: A, B, C, D, E: letras iguais denotam ausência de diferença estatística significativa - Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,0021$)

Gráfico 4 – Médias, em UFC/mL, de *Streptococcus agalactiae* de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: a, b, c, d: letras iguais denotam ausência de diferença estatística significativa - Teste de Scheffé ($p < 0,001$)

Gráfico 5 – Médias, em UFC/mL, de *Corynebacterium bovis* de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: A, B, C, D, E: letras iguais denotam ausência de diferença estatística significativa - Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,0021$)

Gráfico 6 – Médias, em UFC/mL, de *Prototeca zopfii* de acordo com o tratamento aplicado – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

Legenda: a, b, c, d : letras iguais denotam ausência de diferença estatística significativa - Teste de Scheffé ($p < 0,001$)

Gráfico 7 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *C. bovis* e *P. zopfii* – São Paulo – 2014

Fonte: (SELLERA, 2014)

No atinente à citotoxicidade induzida por meio da PDT, existe o questionamento científico sobre os efeitos deletérios da mesma sobre as células sadias do organismo exposto e em relação aos possíveis efeitos sistêmicos determinados pela PDT no hospedeiro. O presente estudo foi realizado em caráter experimental *in vitro* unicamente, restando, portanto, questionamentos acerca dos efeitos do emprego da técnica em tecidos vivos, sobretudo, no tecido glandular mamário.

Desta forma, a literatura compulsada apresenta estudos com resultados que corroboram e dão suporte ao emprego da mesma em tecidos vivos, demonstrando a segurança do emprego da técnica em procedimentos clínicos.

Embora exista um número relativamente baixo de estudos realizados a fim de elucidar os efeitos da PDT mediada por fenotiazínicos em células saudáveis ou de possíveis efeitos da técnica sobre o sistema imunológico, há, em grande parte da literatura, estudos envolvendo a ação da PDT sobre fibroblastos, queratinócitos ou neutrófilos, principalmente no que tange o processo de cicatrização.

De acordo com o demonstrado por Brown (2012), a luz não absorvida por micro-organismos pode ser absorvida por cromóforos do tecido, desencadeando uma resposta similar ao processo de biomodulação, isto é, demonstrando capacidade de estimular ou inibir processos celulares que, comprovadamente, podem influenciar no processo de cicatrização por diversos mecanismos. Deste modo, segundo o autor, a PDT poderia apresentar dois efeitos sinérgicos: controle de micro-organismos e aceleração do processo de reparação tecidual.

Em estudo realizado por Tanaka et al. (2012), os autores avaliaram a ação da PDT com diversos FS(s) sobre *S. aureus* multirresistente e neutrófilos isolados do sangue de ratos. Os autores concluíram que a dose necessária para inativar *S. aureus* com AT e AM foi muito inferior do que para causar danos aos neutrófilos. Mais do que isso, os neutrófilos não mostraram quaisquer alterações morfológicas notáveis durante irradiação utilizando AT e AM e a viabilidade de neutrófilos foi mantida continuamente em nível elevado (> 80%, com fluências de 5 ou 20J/cm²), levando os autores a postular que a PDT mediada por AT ou AM, sob concentrações ótimas para inativar *S. aureus*, não ocasionou efeitos citotóxicos em neutrófilos.

Da mesma forma, em estudo realizado por Noodt et al. (1998), ou autores

avaliaram a ação da PDT com um derivado do AM, *in vitro*, em fibroblastos de hamster. Os resultados obtidos levaram os autores a concluir que a atividade enzimática do complexo de Golgi, dos lisossomos e do retículo endoplasmático não foi afetada.

Segundo Zeina et al. (2002), a ação da PDT sobre queratinócitos humanos, utilizando luz policromática de um projetor de slides com comprimento de onda variando entre 400 e 700nm, taxa de fluência de 42mW/cm² e AM, exibiu baixa toxicidade contra queratinócitos. A viabilidade celular verificada após seis horas da aplicação da PDT foi de 91% em 60 minutos de PDT e de 68% na PDT de 90 minutos.

Sabe-se que a PDT é capaz de estimular muitos aspectos da resposta imune em mamíferos, incluindo neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos-T e mastócitos. Contudo, estes estudos foram dirigidos para a aplicação de PDT anti-neoplásica, com o emprego de diferentes dosimetrias químicas, luminosas e até mesmo outros FS(s) (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006), deste modo, torna-se fundamental elucidar os efeitos da PDT antimicrobiana, sob os parâmetros empregados, nas células do hospedeiro (TANAKA et al., 2012).

Baseando-se nestes estudos e considerando a hipótese da não indução de danos às células sadias da glândula mamária e do leite por parte da aplicação da PDT, os resultados de estudos direcionam à segurança da aplicação da mesma em tecidos sadios, não induzindo prejuízo à saúde celular da mama e do leite, fato este, determinante para a inclusão ou exclusão da técnica para o tratamento da mastite bovina e para o desenvolvimento de testes clínicos em animais que apresentam a enfermidade. Entretanto, ainda que a baixa citotoxicidade e elevada segurança da técnica tenham sido demonstrados em uma gama de tipos celulares sadios, existe ainda a falta de estudos e resultados de avaliação da citotoxicidade da PDT em leucócitos isolados do leite bovino e do tecido glandular mamário, determinando o limiar de sobrevivência destas células à PDT, assim como as possíveis alterações na viabilidade das mesmas.

Outro fator que merece destaque e é passível de questionamento na possibilidade do tratamento clínico desta doença por meio da PDT, é a presença do leite proveniente da glândula mamária criando uma barreira física para a luz, impedindo sua transmissão, espalhamento e sua absorção. Entretanto, Matevski et al. (2003) demonstraram, em fluidos corporais como a saliva e o sangue, que a

ação da PDT foi eficaz na inativação de bactérias. Este fato deve ser, portanto, melhor abordado em estudos futuros pela possível interferência na reprodutibilidade dos parâmetros propostos no presente estudo.

Outro fato a ser abordado na transposição de um estudo *in vitro* para um estudo clínico é a entrega da luz sobre o tecido glandular. Diferentemente dos aparelhos já desenvolvidos e que comprovadamente têm sido utilizados como ferramentas eficazes para tratar diferentes enfermidades na Medicina, Fisioterapia, Odontologia e até mesmo na Medicina Veterinária, um equipamento adequado para tratar a mastite bovina deve ser capaz de irradiar todas as estruturas envolvidas, uma vez que os micro-organismos podem estar distribuídos por toda glândula mamária.

Também é importante ressaltar que, até o presente momento, nenhum estudo demonstrou que a PDT pode induzir a seleção de micro-organismos resistentes. Possivelmente, a ausência desta seleção seja explicada devido as EROS formadas atuarem em múltiplos alvos, inviabilizando qualquer tipo de seleção (DAI, HUANG; HAMBLIN, 2009).

Dentre os micro-organismos abordados no presente estudo, dois são dignos de maior atenção. O gênero *Staphylococcus*, em especial cepas de *S. aureus*, são conhecidos por apresentarem grande resistência a antibióticos, o que resulta na importância de novas pesquisas sobre o controle da propagação destas bactérias na glândula mamária (POL; RUEGG, 2007). O gênero *Prototheca* também recebe atenção especial principalmente por, até o presente momento, não existir descrição de tratamentos eficazes das infecções da glândula mamária de onde esses patógenos foram originalmente isolados (SOBUKAWA et al., 2011). Os resultados do presente estudo demonstraram que, nas condições propostas, ambos os agentes foram susceptíveis a ação da PDT, demonstrando o potencial para sua aplicação clínica.

Os achados do presente estudo corroboram com os achados de numerosos estudos sobre a aplicação da PDT em micro-organismos. Muitos estudos demonstraram a citotoxicidade da PDT mediada por fenotiazínicos em cepas de *S. aureus* e MRSA, *in vitro*, em animais de laboratório e seres humanos, demonstrando sua ação citotóxica contra estes micro-organismos (USACHEVA; TEICHER; BIEL, 2001; ZOLFAGHAR et al., 2009; KASHEF et al., 2011; MIYABE et al., 2011; KASHEF; RAVAEI SHARIF ABADI; DJAVID, 2012; BIEL et al., 2013;

TUBBY et al., 2013; REIS JUNIOR et al., 2014), contudo não são descritos na literatura estudos envolvendo cepas de *S. aureus* envolvidos na gênese da mastite bovina.

Todavia, apesar dos resultados de sucesso e a promissora aplicação da técnica, alguns estudos demonstraram que nem sempre a PDT conduz à cura completa. Apesar deste resultado, é indiscutível a capacidade da mesma em diminuir a carga microbiana, facilitando a recuperação do paciente quando então associada às terapias existentes.

Em estudo realizado por Chibebe Júnior et al. (2013), larvas de *Galleria mellonella* foram infectadas com *Candida albicans* e posteriormente tratadas com PDT mediada por AM e luz vermelha. A aplicação de PDT proporcionou aumento de sobrevivência das larvas infectadas e a diminuição da carga fúngica na hemolinfa das mesmas. Ainda no mesmo estudo, os autores infectaram a larva com cepa de *Candida albicans* resistente ao fluconazol e associaram, no tratamento, a PDT ao fluconazol. Os autores observaram que a cepa de *Candida albicans* resistente ao fluconazol apresentou, após a PDT, maior susceptibilidade ao antifúngico utilizado, demonstrando a possibilidade de associação entre os dois tratamentos para aumentar a eficácia terapêutica, sucesso do tratamento e recuperação do paciente.

Uma vez que a origem da mastite pode ser atribuída a uma vasta gama de micro-organismos patogênicos espalhados pela glândula mamária e no leite (PHILPOT; NICKERSON, 2000), o sucesso para a inativação microbiológica por meio da PDT para tratar esta doença pode depender de variáveis, que são descritas por Jori et al. (2006), tais como a concentração do FS, a espécie do micro-organismo alvo, a fonte de luz e dose empregada.

Diversos estudos demonstraram a fotoinativação de bactérias e fungos utilizando lasers, LEDs e outras fontes de luz para PDT. Contudo, segundo estudo de Zanin et al. (2006), os LEDs vêm se destacando com grande potencial para PDT, principalmente pela redução do custo do tratamento quando comparados a outras fontes de luz.

Baseando-se na importância da doença, fatores como custo de tratamento, alto número de animais acometidos e praticidade da técnica, tornam as fontes de luz compostas por LEDs os equipamentos de eleição a serem desenvolvidos para a irradiação da glândula mamária.

Apesar das abundantes informações que circundam a aplicação da PDT em

micro-organismos patogênicos, não foram encontrados estudos correlacionando a aplicação da PDT em *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *C. bovis*, e *P. zopfii* e, até o presente momento, não foram descritos estudos demonstrando a aplicação da PDT em algas patogênicas, tornando este estudo pioneiro.

7 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos, concluiu-se que:

1. O azul de metileno na concentração de 1mM, associado a um diodo emissor de luz de $\lambda = 660\text{nm}$, é capaz de inativar significativamente, *in vitro*, os micro-organismos *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *C. bovis*, e *P. zopfii*.
 - 1a. *S. dysgalactiae* foi inativado sob 30 segundos de irradiação ($3,05 \text{ J/cm}^2$);
 - 1b. *S. agalactiae* foi inativado sob 2 minutos de irradiação ($12,22 \text{ J/cm}^2$);
 - 1c. *S. aureus* foi inativado sob 30 segundos de irradiação ($3,05 \text{ J/cm}^2$);
 - 1d. *C. bovis* foi inativado sob 30 segundos de irradiação ($3,05 \text{ J/cm}^2$);
 - 1e. *P. zopfii* foi inativado sob 2 minutos de irradiação ($12,22 \text{ J/cm}^2$).
2. A luz isoladamente, na densidade de energia de $12,22 \text{ J/cm}^2$, não apresentou, *in vitro*, efeito citotóxico sobre os micro-organismos *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *C. bovis*, e *P. zopfii*.
3. O fotossensibilizador azul de metileno, isoladamente, na concentração de 1mM, não apresentou efeito citotóxico sobre os micro-organismos *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *C. bovis*, e *P. zopfii*.
4. A terapia fotodinâmica é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas relativas à mastite bovina.
5. O fato de não existirem trabalhos na literatura envolvendo a fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina, torna esse estudo pioneiro e motivador para estudos subsequentes que elucidem os mecanismos envolvidos entre a PDT e a mastite bovina.

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIABATA, H. C. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 27-42, 2004.
- ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 6, p. 1310-1317, 1995.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consolidado de normas da COFID**. Brasília, abr, 2013. p. 178. Versão IV. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6805ba804f5ea576920df79a71dcc661/ConsolidadoVersaoIVpublicar.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 24 mar. 2014.
- BABILAS, P.; KARRER, S.; SIDOROFF, A.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Photodynamic therapy in dermatology - an update. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, p. 142-149, 2005.
- BAGNATO, V. S. Luz contra os agressores. **Revista FAPESP**, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2007/09/19/luz-contra-os-agressores/>>. Acesso em: 24 abr. 2014.
- BAHNER, J. D.; BORDEAUX, J. S. Non-melanoma skin cancers: photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 6, p. 792-798, 2013.
- BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.
- BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, n. 4, p. 383-407, 2011.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.
- BAUER, A. W.; PERRY, D. M.; KIRBY, W. M. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. **Journal of the American Medical Association**, v. 173, p. 475-480, 1960.
- BEAUDEAU, F.; FOURICHON, C.; SEEGER, H.; BAREILLE, N. Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, n. 1-2, p. 43-54, 2002.

BIEL, M. A.; PEDIGO, L.; GIBBS, A.; LOEBEL, N. Photodynamic therapy of antibiotic-resistant biofilms in a maxillary sinus model. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 3, n. 6, p. 468-473, 2013.

BLACK, R. T.; MARSHALL, R. T.; BOURLAND, C. T. Locus of mammary gland infections of *Corynebacterium bovis*. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 4, p. 413-416, 1972.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. W. **Mastitis control in dairy herds**. Ipswich, Farming Press, 1995. p. 29.

BOCHNIARZ, M.; WAWRON, W. Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 3, p. 405-410, 2011.

BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A.; GREEN, M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. **Farm Animal Practice**, v. 27, n. 6, p. 310-315, 2005.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BRITTEN, A. M. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 187-202, 2012.

BROWN, S. Clinical antimicrobial photodynamic therapy: phase II studies in chronic wounds. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 10, n. 2, p. 80-83, 2012.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck and CO, 1996. p. 1035.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; DIAS FILHO, F. C. *Prototheca zopfii*: importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 273-283, 2006.

BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; BRANDA, E.; GORETTI, M.; AMICI, M.; LAGNEAU, P. E.; SCACCABAROZZI, L.; BRONZO, V.; MORONI, P. Large-scale screening of the in vitro susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene antibiotics. **Medical Mycology**, v. 46, n. 5, p. 511-514, 2008.

CARRÉ, V.; GAUD, O.; SYLVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO, M.; BLAIS, J.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; GUILLOTON, M. Fungicidal properties of meso-aryl glycosylporphyrins: 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, 1999.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality?. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005.

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, 2004.

CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 535–545, 2006.

CHELI, R.; ADDIS, F.; MORTELLARO, C. M.; FONDA, D.; ANDREONI, A.; CUBEDDU, R. Hematoporphyrin derivative photochemotherapy of spontaneous animal tumors: clinical results with optimized drug dose. **Cancer letters**, v. 23, n. 1, p. 61-66, 1984.

CHIBEJE JUNIOR, J.; SABINO, C. P.; TAN, X.; JUNQUEIRA, J. C.; WANG, Y.; FUCHS, B. B.; JORGE, A. O.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 217, 2013.

CHIRICO, J.; JONSSON, P.; KJELLBERG, S.; THOMAS, G. Summer mastitis experimentally induced by *Hydrotaea irritans* exposed to bacteria. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 187-192, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal. Approved standard M31-A3. 3. ed. [S.l.]: CLSI, 2008. v. 28, 116 p.

CONZUELO, F.; CAMPUZANO, S.; GAMELLA, M.; PINACHO, D. G.; REVIEJO, A. J.; MARCO, M. P.; PINGARRÓN, J. M. Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, n. 50, p. 100-105, 2013.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S, GÓRNIK, S. L, BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 443-455.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N.; RIBEIRO, M. G.; TORRES, J. A. Etiologia e sensibilidade microbiana *in vitro* da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 139-151, 2006.

COUTO, R. Bactérias multirresistentes. In: COUTO, R.; PEDROSA, T. M. G.; NOGUEIRA, J. M. **Infecção hospitalar e outras complicações não infecciosas da doença**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p. 557-588.

CRUPPE, L. H.; FOE, F. H.; FRANCO, F.; VASCONCEOS, C. Characteristics of mastitis agents in Brazilian dairy farms. In: ANNUAL MEETING OF THE

NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2008, New Orleans, Louisiana. **Anais...**
Washington: National Mastitis Council, 2008. p. 218-219.

CULLOR, J. S. Antibiotic residue tests for mammary gland secretions. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 609-620, 1993.

DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 170-188, 2009.

DEB, R.; KUMAR, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A. K.; TIWARI, R.; DHAMA, K.; SINGH, U.; KUMAR, S. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 23, p. 1653-1661, 2013.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archives of Oral Biology**, v. 37, n. 11, p. 883-887, 1992.

REIS JUNIOR, J. A. dos; CARVALHO, F. B.; TRINDADE, R. F.; ASSIS, P. N.; ALMEIDA, P. F.; PINHEIRO, A. L. A new preclinical approach for treating chronic osteomyelitis induced by *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* study on photodynamic antimicrobial therapy (PAmT). **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 2, p. 789-795, 2014.

DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K. R.; BOYLE, D. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v. 38, p. 2628-2635, 1978.

DRESCHER, G.; MATTIELLO, S. P.; PEIXOTO, R. M.; VARGAS, A. C.; MACIEL, M. N.; COSTA, M. M. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 188-193, 2010.

DUIJKEREN, E. V.; BOX, A. T. A.; HECK, M. E. O. C.; WANNET, W. J.; FLUIT, A. C. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 1-2, p. 91-97, 2004.

EAGLESOME, M. D.; BIELANSKI, A.; HARE, W. C. D.; RUHNKE, H. L. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and bovine semen by photosensitive agents. **Veterinary Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 277-284, 1994.

EHLING, S.; REDDY, T. M. A liquid chromatography - mass spectrometry method for the quantitative determination of residues of selected veterinary hormones in powdered ingredients derived from bovine milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 48, p. 11782-11791, 2013.

EMILIO, C. R. **Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevuliníco com a de seu metil éster utilizando-se a terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino**. 2008. 127 p. Dissertação (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; JOHNSON, G. L.; HALBERT, L. W. Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of penicillin/novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, n. 2, p. 258-260, 1996.

ERSKINE, R. J.; KIRK, J. H.; TYLER, J. W.; DEGRAVES, F. J. Advances in the therapy for mastitis. **Veterinary Clinics North America Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 499-513, 1993.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **The Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v. 19, n. 1, p. 109-138, 2003.

ESSLEMONT, D.; KOSSAIBATI, M. Mastitis: how to get out of the dark ages. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 85-86, 2002.

FELDMAN, B. C. **Avaliação clínica dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento não-cirúrgico da periodontite crônica**. 2009. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Duque de Caxias, 2009.

FERREIRA, J. L.; LINS, J. L. H. A.; CAVALCANTE, T. V.; MACEDO, N. A.; BORJAS, A. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 261-266, 2007.

FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 4, p. 552-559, 2010.

GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A. J.; BAPTISTA, M. S. Binding, Aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227-232, 2004.

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 Dentistas**, v. 57, n. 3, p. 223-226, 2003.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene alimentar**, v. 9, n. 36, p. 12-16, 1995.

GILABERTE, Y.; ASPIROZ, C.; ALEJANDRE, M. C.; ANDRES-CIRIANO, E.; FORTUÑO, B.; CHARLEZ, L.; REVILLO, M. J.; HAMBLIN, M. R.; REZUSTA, A.

Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: an in vitro and in vivo study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 1, p. 54-57, 2014.

GONÇALVES, J. L. **Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.** 2012. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Pirassununga.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman: the pharmacological basis of therapeutics.** 9th ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 1436.

GREGORY, L.; BIRGEL, E. H.; HOEDEMAKER, M.; GRUNERT, E. Mastite dos bovinos: Histórico de suas formas clínicas. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 3, p. 31-38, 2001.

HADDAD, R.; KAPLAN, O.; BRAZOVSKI, E.; RABAU, M.; SCHNEEBAUM, S.; SHNAPER, A.; SKORNICK, Y.; KASHTAN, H. Effect of photodynamic therapy on normal fibroblasts and colon anastomotic healing in mice. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 3, n. 6, p. 602-606, 1999.

HAGE, R.; MANCILHA, G.; ZANGARO, R. A.; MUNIN, E.; PLAPLER, H. Photodynamic therapy (PDT) using intratumoral injection of the 5- aminolevulinic acid (5-ALA) for the treatment of eye cancer in cattle. **Proceedings of SPIE**, v. 6427, p. 642-671, 2007.

HAIDARIS, C. G.; FOSTER, T. H.; WALDMAN, D. L.; MATHES, E. J.; MCNAMARA, J.; CURRAN, T. Effective photodynamic therapy against microbial populations in human deep tissue abscess aspirates. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 45, n. 8, p. 509-516, 2013.

HAJIM, K. I.; SALIH, D. S.; RASSAM, Y. Z. Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 5, p. 743-748, 2010.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemistry and Photobiology Science**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HANAKOVA, A.; BOGDANOVA, K.; TOMANKOVA, K.; PIZOVA, K.; MALOHLAVA, J.; BINDER, S.; BAJGAR, R.; LANGOVA, K.; KOLAR, M.; MOSINGER, J.; KOLAROVA, H. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. **Microbiological Research**, v. 169, n. 2-3, p. 163-70, 2014.

HAYEK, R. R.; ARAÚJO, N. S.; GIOSO, M. A.; FERREIRA, J.; BAPTISTA-SOBRINHO, C. A.; YAMADA, A. M.; RIBEIRO, M. S. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial

reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 8, p. 1275-1281, 2005.

HERTL, J. A.; SCHUKKEN, Y. H.; WELCOME, F. L.; TAUER, L. W.; GRÖHN, Y. T. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1465-1480, 2014.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow a tradition or an archaism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1250-1255, 2005.

HORTET, P.; SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1-4, p.1-20, 1998.

HOWELL, D. Survey on mastitis caused by environmental bacteria. **The Veterinary Record**, v. 90, n. 23, p. 654-657, 1972.

INNINGS, A.; KRABBE, M.; ULLBERG, M.; HERRMANN, B. Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the rnpB gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5983-5991, 2005.

JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULCSÁR, M.; KERÉNYI, J.; LAUKÓ, T.; KATONA, F.; HUSZENICZA, G. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **The Veterinary Quarterly**, v. 23, n. 2, p. 58-61, 2001.

JETT, B. D.; HATTER, K. L.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v. 23, n. 4, p. 648-650, 1997.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

JORI, G.; MAGARAGGIA, M.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; CAMERIN, M.; TALLANDINI, L.; COPPELLOTTI, O.; GUIDOLIN, L. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water-borne diseases. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 30, n. 3, p. 261-271, 2011.

KASHEF, N.; ESMAEELI DJAVID, G.; SIROOSY, M.; TAGHI KHANI, A.; HESAMI ZOKAI, F.; FATEH, M. Photodynamic inactivation of drug-resistant bacteria isolated from diabetic foot ulcers. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2011.

KASHEF, N.; RAVAEI SHARIF ABADI, G.; DJAVID, G. E. Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2012.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **The Canadian**

Veterinary Journal, v. 38, n. 7, p. 429-437, 1997.

KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 3-7, 2004.

KILIAN, M. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. 9th ed. London: Edward Arnold, 1998. v. 2. p. 634-667.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. A review of low level laser therapy. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161-168, 1991.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

KOSSAIBATI, M. A. The cost of clinical mastitis in UK dairy herds. **Cattle Practice**, v. 8, p. 323-328, 2000.

KOSSAIBATI, M. A.; ESSLEMONT, R. J. The costs of production diseases in dairy herds in England. **The Veterinary Journal**, v. 154, p. 41-51, 1997.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; MARLE, J. V. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005.

LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 578-585, 1994.

LASS-FLÖRL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 230-242, 2007.

LESCOURRET, F.; COULON, J. B. Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 8, p. 2289-2301, 1994.

LIM, S. M.; WEBB, S. A. Nosocomial bacterial infections in intensive care units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. **Anaesthesia**, v. 60, n. 9, p. 887-902, 2005.

LONČAR, B.; STIPETIĆ, M. M.; BARIČEVIĆ, M.; RISOVIĆ, D. The effect of low-level laser therapy on salivary glands in patients with xerostomia. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 3, p. 171-175, 2011.

LOWY, F. D. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen?. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 341-343, 2000.

LUCROY, M. D. Photodynamic therapy for companion animals with cancer. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 32, n. 3, p. 693-702, 2002.

MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. Short

communication: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4202-4204, 2006.

MARTINETTO, P.; GARIGLIO, M.; LOMBARD, G. F.; FISCELLA, B.; BOGGIO, F. Bactericidal effects induced by laser irradiation and haematoporphyrin against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 12, n. 4, p. 335-342, 1986.

MARTINS, R. P.; DA SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 8, p. 569-581, 2001.

MATEVSKI, D.; WEERSINK, R.; TENENBAUM, H. C.; WILSON, B.; ELLEN, R. P.; LÉPINE, G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 4, p. 428-435, 2003.

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B. A.; SOUSA, M. I.; EURIDES, D.; LANGONI, H. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias**, v. 5, n.1, p. 107-118, 1999.

MIMICA, M. J.; MENDES C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43 n. 6, p. 399-406, 2007.

MIYABE, M.; JUNQUEIRA, J. C.; COSTA, A. C.; JORGE, A. O.; RIBEIRO, M. S.; FEIST, I. S. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **Brazilian Oral Research**, v. 5, n. 3, p. 230-234, 2011.

MOATS, W. A. Advances in determination of antibiotic residues. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 1, p. 1-4, 1997.

MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E. S.; KIM, M. N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; KOO, H. C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p. 1176-1185, 2007.

MORIN, D. E.; CONSTABLE, P. D. Characteristics of dairy cows during episodes of bacteriologically negative clinical mastitis or mastitis caused by *Corynebacterium* spp. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 6, p. 855-861, 1998.

MROZ, P.; VATANSEVER, F.; MUCHOWICZ, A.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy of Murine Mastocytoma Induces Specific Immune Responses against the Cancer/Testis Antigen P1A. **Cancer Research**, v. 73, n. 21, p. 6462-6470, 2013.

NOODT, B. B.; RODAL, G. H.; WAINWRIGHT, M.; PENG, Q.; HOROBIN, R.;

NESLAND, J. M.; BERG, K. Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. **International Journal of Cancer**, v. 75, n. 6, p. 941-948, 1998.

NÚÑEZ, S. C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de ortotoluidina com relação à eficiência fotodinâmica**. 2007. 127 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

OLIVER, S. P.; ALMEIDA, R. A.; GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. J.; DOWLEN, H. H.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; CHESTER, S. T.; MOSELEY, W. M. Extended ceftiofur therapy for treatment of experimentally-induced *Streptococcus uberis* mastitis in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3322-3329, 2004.

OLIVER, S. P.; ALMEIDA, R. A.; GILLESPIE, B. E.; IVEY, S. J.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H. H.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C. Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced *Streptococcus uberis* intramammary infections in lactating dairy cattle. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 299-308, 2003.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 2, p. 165-185, 2012.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E.; JAYARAO, B. M. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 3, p. 337-355, 2011.

OVERESCH, G.; STEPHAN, R.; PERRETEN, V. Antimicrobial susceptibility of gram-positive udder pathogens from bovine mastitis milk in Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 155, n. 6, p. 339-350, 2013.

PEDERSEN, L. H.; AALBAEK, B.; RONTVED, C. M.; INGVARTSEN, K. L.; SORENSEN, N. S.; HEEGAARD, P. M.; JENSEN, H. E. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *streptococcus uberis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, n. 2-3, p. 156-164, 2003.

PEDRO, R. J.; BRANCHINI, M. L. M. Estafilococcias. In. VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 654-665.

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, 1996.

PERINI, S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina**. 2013. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

PFALLER, M. A.; BURMEISTER, L.; BARTLETT, M. S.; RINALDI, M. G. Multicenter

evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 1437-1441, 1988.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Winning the fight against mastitis**. Naperville, IL: Westfalia-Surge, 2000. 188 p.

PIRES, L.; BOSCO, S. D. E. M.; BAPTISTA, M. S.; KURACHI, C. Photodynamic therapy in *Pythium insidiosum* - an *In Vitro* study of the correlation of sensitizer localization and cell death. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85431, 2014.

PIRES, L.; BOSCO, S. D. E. M.; DA SILVA, N. F. J. R.; KURACHI, C. Photodynamic therapy for pythiosis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 130-136, 2013.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 262-273, 2007.

PORE, R. S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathology**, v. 90, p. 129-139, 1985.

PRATES, R. A.; SILVA, E. G.; SUZUKI, L. C.; PAULA, C. R.; RIBEIRO, M. S. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 1, p. 53-57, 2010.

PRATES, R. A.; YAMADA, A. M. JR.; SUZUKI, L. C.; EIKO HASHIMOTO, M. C.; CAI, S.; GOUW-SOARES, S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 86, n.1, p. 70-76, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 67-70.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Diseases of the mammary gland. In: _____ **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. p. 673-762.

RAPUNTEAN, S.; RAPUNTEAN, G.; FIT, N.; CUC, C.; NADAS, G. Morphological and Cultural Characterization of some Strains of Unicellular Algae of the Genus *Prototheca* Sampled from Mastitic Cow Milk. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 37, n. 1, p. 31-40, 2009.

REKSEN, O.; SØLVERØD, L.; BRANSCUM, A. J.; ØSTERÅS, O. Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2928-2937, 2007.

RICCHI, M.; DE CICCO, C.; BUZZINI, P.; CAMMI, G.; ARRIGONI, N.; CAMMI, M.; GARBARINO, C. First outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca blaschkeae*. **Veterinary Microbiology**, v. 62, n. 2-4, p. 997-999, 2013.

ROBERSON, J. R. Treatment of clinical mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 2, p. 271-288, 2012.

ROESLER, U.; HOLGER, S.; HENSEL, A. Immunodiagnostic Identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 539-543, 2001.

ROMANOS, G.; NENTWIG, G. Diode Laser (980 nm) in Oral and Maxillofacial Surgical Procedures: Clinical Observations Based on Clinical Applications. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 17, n. 5, p. 193-197, 1999.

RUEGG, P. L. Practical food safety interventions for dairy production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. E1-E9, 2003

RUOFF, K. L.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Streptococcus. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003. p. 405-421.

RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 99-111, 2000.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SARGEANT, J. M.; SCOTT, H. M.; LESLIE, K. E.; IRELAND, M. J.; BASHIRI, A. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 39, n. 1, p. 33-38, 1998.

SCHUKKEN, Y. H.; ERB, H. N.; SEARS, P. M.; SMITH, R. D. Ecologic study of the risk factors for environmental mastitis in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 766-799, 1988.

SEGURA, M.; GOTTSCHALK, M. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1157-1188, 2004.

SENA, R. M. M. **Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul de metileno em vaginite causada por *Candida albicans***. 2013. 87 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2013.

SILBERT, T.; BIRD P. S.; MILBURN, G. J.; WALSH, L. J. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization. **Journal of Dental Research**, v. 79, p. 569, 2000.

SILVA GARCEZ, A.; NÚÑEZ, S. C.; LAGE-MARQUES, J. L.; JORGE, A. O.; RIBEIRO, M. S. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* *in vitro*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 102, n. 4, p. 93-98, 2006.

SILVEIRA-FILHO, V. M.; LUZ, I. S.; CAMPOS, A. P.; SILVA, W. M.; BARROS, M. P.; MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M. F.; MOTA, R. A.; SENA, M. J.; LEAL-BALBINO, T. C. Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk and dairy products in northeast Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 4, p. 583-591, 2014.

SIMÕES, A.; PLATERO, M. D.; CAMPOS, L.; ARANHA, A. C.; EDUARDO, C. D. E. P.; NICOLAU, J. Laser as a therapy for dry mouth symptoms in a patient with Sjögren's syndrome: a case report. **Special Care in Dentistry**, v. 9, n. 3, p. 134-137, 2009.

SISCHO, W. M. Quality milk and tests for antibiotic residues. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1065-1073, 1996.

SOBUKAWA, H.; WATANABE, M.; KANO, R.; ITO, T.; ONOZAKI, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. *In vitro* algacide effect of disinfectants on *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 11, p. 1527-1529, 2011.

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 91-102, 2003.

SOUKOS, N.; WILSON, M.; BURNS, T.; SPEIGHT, P. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.

SOUTO, L. I.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Relationship between occurrence of mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienic-sanitary quality. **The Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 1, p. 121-127, 2008.

SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Revista Ciência Hoje**, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Pyrrolic photosensitizers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 293-324, 1996.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.

SUÁREZ, C.; PEÑA, C.; TUBAU, F.; GAVALDÀ, L.; MANZUR, A.; DOMINGUEZ, M. A.; PUJOL, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Clinical impact of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. **Journal of Infection**, v. 58, n. 4, p. 285-290, 2009.

TANAKA, M.; KINOSHITA, M.; YOSHIHARA, Y.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S.; NEMOTO, K.; HIRAYAMA, T.; DAI, T.; HUANG, L.; HAMBLIN, M. R.; MORIMOTO, Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill

bacteria but spare neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 1, p. 227-232, 2012.

TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M. T.; PYÖRÄLÄ, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2610-2617, 2009.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 4, n. 5 p. 3-10, 2006.

TUBBY, S.; WILSON, M.; WRIGHT, J. A.; ZHANG, P.; NAIR, S. P. *Staphylococcus aureus* small colony variants are susceptible to light activated antimicrobial agents. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 201, 2013.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue O bacterial efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.; MARLAND, J.; WAREING, D.; BOLTON, F. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75-80, 1997.

WARDLAW, J. L.; SULLIVAN, T. J.; LUX, C. N.; AUSTIN, F. W. Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections. **The Veterinary Journal**, v. 192, n. 3, p. 374-377, 2012.

WEIS, S. A.; DEN BERGH, H. V.; GRIFFIOEN, A. W.; NOWAK-SLIWINSKA, P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, n. 1, p. 53-70, 2012.

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 27-45, 2002.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; CASE, K. L.; GARRISON, L. L.; GRÖHN, Y. T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1664-1670, 1999.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2592-2598, 1997.

WRIGHT, C. L. Antibiotic residues in milk. **The Veterinary Record**, v. 108, n. 1, p. 20, 1981.

WYSS, P. History of Photomedicine. In: WYSS, P.; TADIR, Y.; TROMBERG, B. J.; HALLER, U. **Photomedicine in gynecology and reproduction**. 2nd.ed. Switzerland: Karger Publishers, 2000. p. 4-11.

ZAINI, F.; KANANI, A.; FALAHATI, M.; FATEH, R.; SALIMI-ASL, M.; SAEMI, N.; FARAHYAR, S. H.; KHEIRABAD, A. K.; NAZERI, M. Identification of *Prototheca zopfii* from Bovine Mastitis. **Iranian Journal of Public Health**, v. 41, n. 8, p. 84-88, 2012.

ZANIN, I. C.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L. K.; PIMENTA, L. A.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, n. 1, p. 64-69, 2006.

ZECCONI, A. Contagious mastitis control program: the *Staphylococcus aureus* case. **Cattle Practice**, v. 14, n. 2, p. 65-75, 2006.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; CORRY, D.; PURCELL, W. M. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. **The British journal of dermatology**, v. 146, n. 4, p. 568-573, 2002.

ZHOU, Y.; REN, Y.; FAN, C.; SHAO, H.; ZHANG, Z.; MAO, W.; WEI, C.; NI, H.; ZHU, Z.; HOU, X.; PIAO, F.; CUI, Y. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 8, p. 1709-1714, 2013.

ZOCCAL, R.; OLIVEIRA, O. C.; ALMEIDA, M. M. T. B. Pecuária de leite pode aumentar muito no Brasil. **ANUALPEC: anuário da pecuária brasileira**, cap. 6, p. 229-256, 2012.

ZOLFAGHARI, P. S.; PACKER, S.; SINGER, M.; NAIR, S. P.; BENNETT, J.; STREET, C.; WILSON, M. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 27, 2009.