

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA CONTROLE DE
AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA**

Luiz Henrique Barbosa Pires
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza

GOIÂNIA
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Luiz Henrique Barbosa Pires

3. Título do trabalho

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA CONTROLE DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 13/08/2025, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Barbosa Pires, Discente**, em 13/08/2025, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5568783** e o código CRC **1CAAB772**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Luiz Henrique Barbosa Pires

3. Título do trabalho

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA CONTROLE DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2025, às 07:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Barbosa Pires, Discente**, em 22/10/2025, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5738709** e o código CRC **319B8955**.

LUIZ HENRIQUE BARBOSA PIRES

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA CONTROLE DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:

Ciência Animal e Saúde Única

Linha de pesquisa:

Medicina Preventiva, Clínica, Cirurgia e Diagnóstico

Orientador:

Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza – ICB/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Ana Carolina Borsanelli – EVZ/UFG

Prof. Dr. Pablo José Gonçalves – IF/UFG

GOIÂNIA

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pires , Luiz Henrique Barbosa
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA CONTROLE DE AGENTES
INFECCIOSOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA [manuscrito] /
Luiz Henrique Barbosa Pires . - 2025.
LXIV, 64 f.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza ; co
orientadora Dra. Ana Carolina Borsanelli ; co-orientador Dr. Pablo
José Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2025.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Mastite Bovina . 2. Saúde Única. 3. Resistência antimicrobiana.
4. TFDa. 5. Porfirinas. I. , Guilherme Rocha Lino de Souza, orient. II.
Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 662 da sessão de Defesa de Dissertação de **Luiz Henrique Barbosa Pires** que confere o título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração em Ciência Animal e Saúde Única.

Ao primeiro dia do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e cinco, a partir das 09 horas e 00 minutos, de forma remota, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA CONTROLE DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA”. Os trabalhos foram instalados pelo orientador, professor doutor **Guilherme Rocha Lino de Souza** (PPGCA/DBBM/ICB/UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: professor doutor **Alysson Benite de Freitas** (IFG/Câmpus Jataí - Memória), membro titular externo à instituição, e professor doutor **Leonardo Pereira Franchi** (DBBM/ICB/UFG), membro titular externo ao programa. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo professor doutor Guilherme Rocha Lino de Souza, presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos primeiro dia do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e cinco.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Pereira Franchi, Professor do Magistério Superior**, em 15/09/2025, às 11:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 15/09/2025, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alysson Benite De Freitas, Usuário Externo**, em 15/09/2025, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5650612** e o código CRC **77517C7A**.

Referência: Processo nº 23070.032041/2025-01

SEI nº 5650612

Dedico esse trabalho a Deus fonte de infinita sabedoria e mestre dos mestres. À minha família que sempre acreditou no meu potencial, e a todos aqueles que acreditam que a ciência é a base para o futuro da humanidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que com sua bondade me fortalece todos os dias.

Agradeço intensamente à minha avó Luzia Maria de Oliveira (*in memoriam*) por nunca ter desistido de mim, pois hoje sou o que sou graças a ela.

Agradeço à minha mãe Janete Barbosa de Souza e ao meu padrasto Antônio Gomes de Silva pelo incentivo, carinho e auxílio nas diversas horas, em especial as mais difíceis.

Agradeço aos meus familiares que me apoiaram, em especial aos meus tios; Divina Cacilda Barbosa e Divino Barbosa de Souza pelo incentivo e pelas orientações.

Agradeço à minha avó Luci Maria, pelo carinho, atenção, zelo e amor. O meu melhor presente foi te conhecer vó.

Agradeço à Walter Rodrigues, Alisson Torquato pela amizade e parceria.

Agradeço ao meu companheiro das diversas horas, Kayk Nazareth pela paciência, amizade e constante apoio ao longo dessa jornada.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro no desenvolvimento dessa pesquisa. Se não fosse esse apoio não teríamos chegados a esses resultados. Agradeço a todos os professores da EVZ -UFG pelos ensinamentos, orientações e auxílios nas atividades.

Agradeço aos colaboradores do Laboratório, em especial Taise Oliveira, Jaqueline Cristine e João Paulo, pelo auxílio, orientações e ensinamentos durante o período de desenvolvimento das atividades, foram momentos de muito aprendizado e companheirismo.

Agradeço imensamente aos meus coorientadores, Prof^a. Dra. Ana Carolina Borsanelli e Prof. Dr. Pablo José Gonçalves, pelo apoio incansável, conselhos valiosos e disponibilidade de recursos, essenciais para o desenvolvimento e conclusão dessa pesquisa.

Agradeço a equipe do Laboratório de Doenças Infecciosas e Bacteriologia, em especial ao técnico Pedro Henrique, pelo auxílio nas diversas atividades desenvolvidas no laboratório.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza, que com sua experiência, profissionalismo e disponibilidade, aliados à paciência e compreensão, foram fundamentais para orientação e o sucesso dessa pesquisa.

Agradeço a Deus pela vida.

RESUMO

A mastite bovina, inflamação da glândula mamária em vacas leiteiras, está frequentemente associada a infecções bacterianas, impactando negativamente a qualidade do leite, o bem-estar animal e a saúde pública. A enfermidade pode manifestar-se nas formas clínica, subclínica ou crônica, gerando perdas econômicas substanciais na produção de lácteos devido à redução do volume de leite e à desvalorização do produto. O tratamento convencional baseia-se no uso de antimicrobianos; no entanto, a aplicação excessiva desses fármacos contribui para o surgimento de resistência bacteriana, ameaçando a saúde animal e humana. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) utilizando porfirinas metaladas com paládio (Porf@DPPE, Porf@DPPP, Porf@DPPB, e Porf@DPPF) contra bactérias isoladas de casos de mastite. Os fotossensibilizadores foram testados em cepas Gram-positivas e Gram-negativas, com análise de suscetibilidade antimicrobiana e sinergia com sulfonamidas. Os testes de sensibilidade antimicrobiana demonstraram potencial para otimizar protocolos terapêuticos, direcionando o combate à resistência patogênica. Os resultados revelaram maior eficácia da TFDa contra bactérias Gram-positivas, com inibição significativa em concentrações entre 6,25–100 μM . O composto Porf@DPPP destacou-se por sua ação ampla, incluindo atividade contra Gram-negativas (25–100 μM). A combinação da TFDa com sulfonamidas reverteu a resistência em *Escherichia coli* após 30 minutos de irradiação, evidenciando efeito sinérgico. A análise de integridade do DNA confirmou danos genômicos pós-TFDa, sugerindo mecanismos oxidativos como base da inativação microbiana. Conclui-se que a TFDa apresenta eficácia contra patógenos associados à mastite e pode ser integrada a antimicrobianos como estratégia promissora para o controle de casos resistentes. Estudos futuros devem focar na avaliação de toxicidade in vivo, otimização de dosagens e integração com medidas preventivas, como higiene rigorosa durante a ordenha e manejo sanitário, para viabilizar sua aplicação prática. Essa abordagem multifatorial, aliada ao uso responsável de antimicrobianos, reforça a promoção da saúde única, conectando saúde animal, humana e ambiental em prol de uma produção leiteira sustentável e segura.

Palavras-chave: mastite, Saúde Única, resistência antimicrobiana, TFDa, porfirinas.

ABSTRACT

Bovine mastitis, an inflammation of the mammary gland in dairy cows, is frequently associated with bacterial infections, negatively impacting milk quality, animal welfare, and public health. The disease can manifest in clinical, subclinical, or chronic forms, causing substantial economic losses in dairy production due to reduced milk yield and product devaluation. Conventional treatment relies on antimicrobial use; however, excessive application of these drugs contributes to the emergence of bacterial resistance, threatening animal and human health. This study aimed to evaluate the efficacy of Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) using palladium-metalated porphyrins (Porf@DPPE, Porf@DPPP, Porf@DPPB, and Porf@DPPF) against bacteria isolated from mastitis cases. The photosensitizers were tested against Gram-positive and Gram-negative strains, with analysis of antimicrobial susceptibility and synergy with sulfonamides. Antimicrobial susceptibility testing demonstrated potential for optimizing therapeutic protocols to combat pathogenic resistance. Results revealed greater aPDT efficacy against Gram-positive bacteria, with significant inhibition at concentrations between 6.25–100 μM . The Porf@DPPP compound stood out for its broad-spectrum action, including activity against Gram-negatives (25–100 μM). The combination of aPDT and sulfonamides reversed the resistance exhibited by *Escherichia coli* against the antimicrobial after 30 minutes of irradiation, demonstrating a synergistic effect. DNA integrity analysis confirmed post-aPDT genomic damage, suggesting oxidative mechanisms as the basis for microbial inactivation. It is concluded that aPDT is effective against mastitis-associated pathogens and can be integrated with antimicrobials as a promising strategy for controlling resistant cases. Future studies should focus on evaluating *in vivo* toxicity, optimizing dosages, and integrating with preventive measures like strict milking hygiene and health management to enable practical application. This multifactorial approach, combined with responsible antimicrobial use, reinforces the promotion of One Health, connecting animal, human, and environmental health for sustainable and safe milk production.

Keywords: mastitis, One Health, antimicrobial resistance, aPDT and porphyrins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abordagem Saúde Única. A figura representa a aplicabilidade da abordagem *One-Health* para manter a complexa interligação entre o bem-estar animal, humano e ambiental. Adaptado (Maity; Ambatipudi, 2021). 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência de patógenos bacterianos contagiosos e ambientais associados à mastite. Adaptado (Morales-Ubaldo et al., 2023). 6

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características de resistência de patógenos bacterianos contagiosos e ambientais associados à mastite bovina. Adaptado (Morales-Ubaldo et al., 2023) _____16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
CCS	Contagem de células somáticas
CMT	<i>Califórnia Mastitis Teste</i>
ML	Mililitro
PCR	Proteína C reativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
WMT	<i>Wiscosin Mastitis Teste</i>
PS	Fotossensibilizador
PDI	Inativação fotodinâmica
UFC	Unidade Formadora de colônia
PDT	Terapia fotodinâmica
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
TFDa	Terapia fotodinâmica antimicrobiana

Sumário

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 1

- 1. INTRODUÇÃO 1
- 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
 - 2.1 DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA MASTITE BOVINA 3
 - 2.2 ETIOLOGIA 5
 - 2.3 PATOGÊNESE 7
 - 2.4 CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE 9
 - 2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO 11
 - 2.6 TRATAMENTO 13
 - 2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE 17
 - 2.8 IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA 19
 - 2.9 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA 22
 - 2.9.1 *Mecanismos de ação da Inativação Fotodinâmica* 22
 - 2.9.2 *Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)* 23
 - 2.10 AVANÇOS RECENTES E PERSPECTIVAS FUTURAS 24
- REFERÊNCIAS 1

CAPÍTULO 2 – PHOTOINACTIVATION OF MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS 29

- ABSTRACT 29
- INTRODUCTION 30
- METHODS 31
 - Photosensitizers 31
 - Triplet states measurements 32
 - Singlet oxygen measurements 33
 - Bacteria strains 34
 - Antimicrobial susceptibility testing 34
 - Photodynamic Inactivation 34
 - Evaluation of the synergy between PSs and conventional antimicrobials 35
 - Bacterial DNA Integrity Analysis 35
- RESULTS AND DISCUSSIONS 36
 - Photophysical characterization 36
 - Antibiogram 38
 - Bacterial photoinactivation 40
 - Antibiotic-PSs synergy 46
- CONCLUSION 47
- REFERENCES 48

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS 52

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução

O Brasil é reconhecido como um dos maiores produtores de leite do mundo, desempenhando um papel relevante no mercado global. A atividade leiteira não apenas gera empregos diretos, mas também impulsiona uma cadeia de serviços indiretos, contribuindo significativamente para a economia. No entanto, o setor enfrenta desafios constantes, como a perda de produtividade do rebanho e os elevados custos associados ao tratamento, controle e prevenção da mastite bovina (Hogeveen et al., 2011; Massote et al., 2019; Da Rocha; Carvalho; De Resende, 2020).

A mastite bovina é a principal doença que acomete os rebanhos leiteiros de todo o mundo. Caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária, de etiologia multifatorial e consequências complexas. Essa enfermidade compromete significativamente a saúde e o bem-estar dos animais, pois frequentemente está associada a dor e desconforto, podendo levar à perda funcional da glândula mamária e, em casos graves, à morte do animal (Winder et al., 2019; Kaseke et al., 2023).

A mastite pode manifestar-se de duas formas: clínica e subclínica, ambas causando alterações no tecido glandular da vaca. Na forma clínica, os sintomas são evidentes, incluindo a presença de pus, grumos no leite, edema, hiperemia e aumento de temperatura da glândula mamária. Já a mastite subclínica, não há sinais visíveis, mas ocorre um aumento significativo na contagem de células somáticas no leite (CCS), indicando uma inflamação latente. Essa enfermidade pode ser causada por uma variedade de agentes, entre eles, estão: bactérias, algas, fungos e vírus (Zimmermann; Araújo, 2017; Gonçalves et al., 2023).

O tratamento da mastite geralmente envolve o uso de antimicrobianos. No entanto, o seu uso estendido e sem orientação adequada é uma das principais causas de resíduos de antibióticos no leite e do desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Essa situação representa um risco para a saúde pública, pois a presença de antibióticos no leite pode causar sérias consequências à saúde humana. Assim, garantir a utilização de medidas alternativas ao uso de antibióticos e a segurança alimentar torna-se prioridade (Langoni et al., 2017; Barberato-Filho et al., 2020).

A Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) apresenta-se como uma alternativa viável no combate aos principais agentes causadores da mastite bovina. Essa técnica utiliza um composto fotossensibilizador (FS), luz em um comprimento de onda específico e oxigênio molecular. Quando ativado pela luz o FS promove a formação de espécies reativas de oxigênio

(ERO) como oxigênio singlete e radicais livres, que danificam estruturas celulares de microorganismos, levando à sua inativação. Esses mecanismos são particularmente vantajosos por sua ação rápida e baixo risco de induzir resistência bacteriana, uma vez que o estresse oxidativo atinge múltiplos alvos nas cepas simultaneamente (Sellera et al., 2016; Couto et al., 2020; Rodrigues et al., 2021).

A aplicação da TFDa estende-se a diversas áreas, incluindo saúde humana, veterinária e agricultura. Os benefícios da técnica incluem versatilidade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e protozoários. A TFDa representa uma técnica promissora na era pós-antibiótica, oferecendo soluções inovadoras para as infecções resistentes, descontaminação de ambientes clínicos e industriais e potencial para minimizar os riscos à saúde pública e à segurança alimentar (Couto et al., 2020).

Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da inativação fotodinâmica em bactérias isoladas de casos de mastite bovina, apresentando uma alternativa inovadora e sustentável para o controle da doença.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Definição e importância econômica da mastite bovina

A mastite bovina é uma inflamação que acomete a glândula mamária de vacas, geralmente ocasionada por origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e/ou infecciosa (Massote et al., 2019). O desenvolvimento da infecção por agentes microbianos é a causa mais frequente de enfermidade, sendo classificada como uma das questões sanitárias mais comuns e importantes em bovinos leiteiros (Dohoo et al., 2011).

A princípio, a mastite é classificada como uma enfermidade associada à produção, e se apresenta de forma clínica, subclínica e crônica (Hogeveen et al., 2011; Cheng; Han, 2020). É reconhecida como um dos principais problemas clínicos e econômicos da pecuária leiteira (Ashraf; Imran, 2020) e constitui a principal questão de saúde em ruminantes leiteiros globalmente (Giagu et al., 2022). Do ponto de vista econômico, a doença resulta em um custo estimado de US\$ 147 por vaca ao ano, demonstrado pelas perdas na produção de leite e pela remoção precoce dos animais no rebanho (Cheng; Han, 2020).

No cenário brasileiro, a produção leiteira é um dos pilares da agropecuária, contribuindo de forma significativa para a economia nacional. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2023), o Brasil produziu aproximadamente 35,4 bilhões de litros de leite em 2022, ocupando a quarta posição global no ranking de produção. O setor envolve mais de 1,3 milhões de produtores, especialmente em pequenas e médias propriedades, gerando emprego e renda em diversas regiões do país.

No entanto, desafios sanitários, como a mastite bovina, comprometem a eficiência produtiva e a qualidade do leite. A mastite reduz a produção em até 20% e altera a composição do leite, levando à contagem bacteriana e prejudicando a industrialização. Estima-se que os prejuízos anuais ultrapassem R\$ 4 bilhões, considerando descarte de leite, custos veterinários e perdas na produtividade (Embrapa, 2023).

Estudos recentes em fazendas brasileiras revelaram que a mastite subclínica (MS), forma mais prevalente (20 -50% dos casos), causa reduções médias de 24,5% na produção de leite e 22,04% na síntese de sólidos totais, variando conforme o patógeno envolvido (Martins et al., 2020). Por exemplo, infecções crônicas por *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* resultam em perdas de 35,3% e 24,5%, respectivamente (Gonçalves et al., 2018; Martins et al., 2020).

A enfermidade afeta diretamente a qualidade e a quantidade do leite produzido, com

redução das porcentagens de gordura, lactose e caseína, além de aumento de cloro e sódio (De Oliveira et al., 2020). A mastite pode intensificar perdas diárias que variam de 1,0 a 2,5 kg durante as primeiras semanas, resultando em uma perda total de 110 a 552 kg de leite durante toda a lactação (Sharun et al., 2021). Estudos realizados em países em desenvolvimento demonstram que 78% das perdas ocasionadas pela mastite estão relacionadas à redução da produção de leite, incluindo 8% em custos com tratamento e 14% devido ao abate de animais (Ashraf; Imran, 2020).

Nesse sentido, os custos envolvem o tratamento da enfermidade, descarte do leite, morte de animais, diminuição da produção e qualidade do leite, prejuízos econômicos à indústria de laticínios, serviços veterinários e diagnóstico (Hogeveen et al., 2011; Mahmmod et al., 2013; Gad, 2025). Ademais, causa perdas no valor do leite comercializado e, por conseguinte, impacto negativo na saúde e bem-estar dos animais acometidos e na economia agrícola (Leigh et al., 2010; Campos et al., 2022; Smistad et al., 2023).

O fator mais relevante é o custo com tratamento associado à mastite, pois o uso de antibióticos, anti-inflamatórios e outras terapias de suporte gera despesas contínuas aos produtores (Sharun et al., 2021). Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias de controle auxilia na diminuição do uso de antibióticos, na redução do descarte precoce de animais para o abate e em custos adicionais de reposição de animais para o rebanho (Simões; De Oliveira, 2012; Ashraf; Imran, 2020).

O aumento de casos gera custos adicionais aos produtores, as perdas proporcionadas pela mastite não podem ser quantificadas com precisão (Hogeveen et al., 2011; Ashraf; Imran, 2020). Quando se trata da mastite subclínica, fica ainda mais difícil quantificar o impacto econômico, pois, ao contrário da forma clínica da doença, ela não apresenta sinais visíveis, dificultando sua detecção precoce. Como resultado, muitos casos permanecem sem diagnóstico, levando à redução silenciosa da produção de leite e a alterações na sua composição (Martins et al., 2020).

Além disso, a mastite subclínica eleva a CCS, o que pode levar à desvalorização do leite no mercado e a diminuição de sua qualidade industrial. Outro fator relevante é o custo indireto associado à persistência da infecção no rebanho, pois animais acometidos têm maior riscos de desenvolver a forma clínica da doença, resultando em abate precoce de animais (Eleodoro et al., 2022).

Além dos custos diretos, a mastite pode afetar a eficiência reprodutiva, afetando indicadores como taxas de concepção, fertilidade e resposta folicular ovariana em vacas. Essas alterações estão relacionadas a atrasos na ciclicidade estral e aumento no intervalo entre partos,

impactando a produtividade do rebanho (Gad, 2025). Adicionalmente, a ausência de medidas estratégicas de controle eficazes, como monitoramento sanitário e protocolos de higiene, pode elevar a taxa de morbidade de até 35% em rebanhos leiteiros (Khazandi et al., 2015; Gad, 2025).

Nesse contexto, as diretrizes da FAO para Boas Práticas na Pecuária de Leite destacam a importância de garantir o bem-estar animal, a sustentabilidade ambiental, a segurança alimentar e a eficiência econômica. Essas recomendações visam equilibrar a produção leiteira com responsabilidade social e ambiental, garantindo a viabilidade do setor ao longo prazo.

2.2 Etiologia

A mastite bovina é uma enfermidade multifatorial que se manifesta de forma clínica e subclínica, variando de acordo com fatores relacionados ao animal, ambiente e presença de patógenos. Considerada um dos maiores desafios sanitários na pecuária leiteira, essa doença é causada por uma ampla variedade de agentes, sendo as bactérias as mais prevalentes. No entanto, fungos, leveduras, vírus e até algas podem estar envolvidos na infecção, contribuindo para a complexidade do seu controle (Simões; De Oliveira, 2012; Sumon et al., 2020).

Agentes não bacterianos, como as leveduras do gênero *Candida* e algas do gênero *Prototheca*, estão entre os principais responsáveis por esse tipo de infecção. Estudos mostram que *Candida* spp. *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp. são comumente isolados de casos de mastite, sendo infecções frequentemente agudas e, em alguns casos, fatais. Além disso, vírus como o herpesvírus bovino (BHV-1 e BHV-4) também têm sido associados à mastite clínica e subclínica, promovendo a necrose do tecido mamário (Wellenberg et al., 2002; Ashraf; Imran, 2020; Bertolini et al., 2022).

As infecções bacterianas podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com sua fonte de infecção: patógenos contagiosos e patógenos ambientais (Bradley, 2002). Os patógenos contagiosos são transmitidos de animal para animal, especialmente durante o processo de ordenha (Deng et al., 2021). Já os patógenos de origem ambiental são encontrados principalmente em materiais de cama, poeira, moscas e fezes (Simões; De Oliveira, 2012).

Entre os principais patógenos contagiosos encontrados em vacas estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium*, os quais habitam o úbere e a pele do teto da vaca, colonizando e se desenvolvendo no canal do teto (Cheng; Han, 2020). Já os principais patógenos ambientais incluem *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus aureus* não (Campos et al., 2022). A tabela 1 apresenta a prevalência dos principais patógenos da mastite bovina no mundo.

Tabela 1 - Prevalência de patógenos bacterianos contagiosos e ambientais associados à mastite. Adaptado (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Continentes	País	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. bovis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. uberis</i>
África	Camarões	-	-	-	7,0	2,4	-
	Egito	-	-	-	-	13,59	20,59
	Etiópia	10,3	46,5–72,3	-	6,18–13,31	1,6	-
	Tunísia	-	-	-	-	20,0	-
	Zimbábue	-	16,3	-	-	-	-
Ásia	Bangladesh	-	74,0	-	35,8	-	-
	China	-	-	-	11,1	3,0–51,0	74,40
	Irã	-	20,4	-	-	-	-
	Japão	-	-	3,8	-	12,30	-
	Paquistão	17,54	21,5	-	17,54–19,40	-	-
América	Canadá	0,1	9,9	-	9,0	1,9	0,6
	Argentina	4,4–5,5	21,3–28,1	-	2,1	-	0,4–31,8
	Brasil	-	-	3,0	6,9	-	71,0
	México	-	-	-	7,5–9,0	5,0	-
Europa Oriental	Sérvia	-	4,57–6,9	-	12,12–26,82	1,51	1,51–6,06
Oceania	Austrália	-	-	6,2–76,0	-	-	16,0–39,2

Entre os patógenos contagiosos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são os mais prevalentes nas propriedades leiteiras (Deng et al., 2021). Os *Staphylococcus aureus*, causa mastite contagiosa, que pode ser clínica ou crônica. Esse agente tem capacidade de produzir biofilme, um fator de virulência que auxilia a adesão e colonização do epitélio da glândula mamária (Soares et al., 2021). Ademais, *Staphylococcus aureus* é associado a uma maior redução na produção de leite em comparação com outros patógenos (Ashraf; Imran, 2020). Além disso, é considerado o patógeno mais frequente em rebanhos bovinos em todo o mundo, com uma prevalência de cerca de 50% e uma certa resistência aos tratamentos antimicrobianos, o que pode levar à evolução para quadros de mastite crônica (Fabres-Klein et al., 2015).

O *Streptococcus agalactiae*, é um patógeno intramamário obrigatório, que não faz parte da microbiota normal do úbere (Mahmmod et al., 2013). O *Streptococcus agalactiae* é reconhecido como um agente etiológico comensal em diversos ambientes (Parker et al., 2016). E esse patógeno é um dos mais prevalentes em propriedades leiteiras, sendo responsável por infecções contagiosas, especialmente subclínicas, que podem variar de leve a moderada severidade (Mahmmod et al., 2013; Deng et al., 2021). Suas infecções estão associadas a

elevados níveis de CCS no leite e conseqüentemente, redução da produção leiteira (Cheng; Han, 2020).

As bactérias *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., associadas a coliformes, também estão implicadas na ocorrência de mastite ambiental (Cheng; Han, 2020). Em propriedades rurais, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* são responsáveis em média por 90 a 95% das infecções intramamárias em rebanhos leiteiros (Simões; De Oliveira, 2012).

Em resumo, a etiologia da mastite bovina envolve uma combinação de fatores infecciosos, ambientais, tecnológicos e de manejo, além de características intrínsecas às vacas (Simões; De Oliveira, 2012). A compreensão desses fatores é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle, minimizando o impacto econômico e sanitário da doença na produção de leite (Rollin et al., 2015).

2.3 Patogênese

A infecção bacteriana intramamária tem início com a penetração do patógeno no canal do teto, posteriormente se proliferando por todo o tecido glandular produtor de leite (Goulart; Mellata, 2022). Além disso, a glândula mamária pode apresentar inflamação, seja devido à própria infecção (Ashraf; Imran, 2020) ou como uma resposta física do hospedeiro (Vanderhaeghen et al., 2014), o que leva à liberação de diversas proteínas de defesa imunológica (Giagu et al., 2022).

Fatores relacionados as más condições higiênicas e manejo inadequado favorecem a entrada de micro-organismos, que no caso das bactérias, podem ser Gram-negativas e/ou Gram-positivas, incluindo patógenos de origem ambiental e contagiosa (Ashraf; Imran, 2020). Nesse viés, a prevalência dos micro-organismos está relacionada, ao manejo antes, durante e após a ordenha, incluindo formas corretas de higienização e desinfecção do ambiente, do animal, do profissional e dos materiais utilizados (Simões; De Oliveira, 2012).

A inflamação é a principal resposta à invasão de micro-organismos (Ashraf; Imran, 2020). A resposta inflamatória apresentada durante a mastite, tem por principal objetivo erradicar o patógeno responsável pela infecção e neutralizar as toxinas produzidas pelo patógeno, a fim de regenerar o tecido lesionado do úbere para que o volume de leite produzido seja recuperado (Goulart; Mallata, 2022). A extensão da resposta inflamatória é influenciada tanto pelas características do patógeno quanto por fatores do hospedeiro, tais como; o estágio de lactação, idade, estado imunológico, predisposição genética e condições nutricionais (Ashraf; Imran, 2020).

Inicialmente, as citocinas pró-inflamatórias desempenham a resposta inflamatória em

nível local e sistêmico, ativando e melhorando as funções de macrófagos e neutrófilos (Cheng; Han, 2020). Quando o patógeno invade a glândula mamária, enfrenta a primeira linha de defesa celular, formada por neutrófilos que realizam o processo de fagocitose (Goulart; Mellata, 2022). Os macrófagos, ao secretarem quimiocinas, recrutam grandes quantidades de neutrófilos que predominam no tecido mamário infectado, promovendo uma resposta imune local (Bradley, 2002). Durante o processo de fagocitose, os neutrófilos liberam substâncias químicas, como ERO e proteases, que são fundamentais para a eliminação de micro-organismos patogênicos (Goulart; Mallata, 2022).

Com a finalidade de proteger o tecido mamário contra maiores danos, os neutrófilos entram em apoptose, liberando quimiocinas que atraem macrófagos ao local da infecção, onde esses macrófagos fagocitam os neutrófilos apoptóticos, limitando a liberação de misturas que poderiam danificar o tecido mamário (Goulart; Mellata, 2022). A saúde do úbere e a resposta inflamatória da vaca podem ser determinadas a partir da medição da CCS (Vanderhaeghen et al., 2024).

A princípio, os patógenos que causam a infecção da glândula mamária são altamente adaptados ao seu ambiente, utilizando uma gama de fatores de virulência para garantir sua sobrevivência (Sharun et al., 2021). Esses fatores incluem escapar das respostas imunes do hospedeiro por meio de mecanismos de secreção de hemolisinas, que permitem a invasão do tecido, conseqüentemente, adesão microbiana às células do hospedeiro, facilitando a penetração mais profunda no tecido (Pedersen et al., 2021).

A adesão e invasão das células epiteliais da glândula mamária bovina são amplamente facilitadas pelas proteínas de ligação à fibronectina, denominadas MSCRAMMs, mais especificamente pelas proteínas FnBPA e FnBPB (Campos et al., 2022). Essas proteínas desempenham um papel fundamental na interação entre o patógeno e o hospedeiro, permitindo que as bactérias se fixem nas células epiteliais e iniciem a invasão ou inibição dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Vanderhaeghen et al., 2014).

A imunidade inata apresentada é compreendida por barreiras físicas na ponta do teto, com presença de neutrófilos, macrófagos, citocinas, células *natural killer*, lactoferrina e complemento, que atuam nos estágios iniciais da infecção (Goulart; Mellata, 2022). As proteínas de fase aguda, lactoferrina, catelicidinas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento são liberados no leite durante o processo de inflamação da glândula mamária e podem servir como marcadores de mastite (Giagu et al., 2022).

Durante o processo de inflamação da glândula mamária, observa-se a presença de diversas proteínas antibacterianas e de defesa imunológica (Giagu et al., 2022). Os fatores de

virulência cromossômicos e/ou extracromossômicos expressos pelos patógenos aumentam a resistência e dificultam a fagocitose deles pelas células de defesa (Pedersen et al., 2021). Além disso, o grande número de patógenos envolvidos na mastite dificulta o controle da infecção (Ashraf; Imran, 2020).

Para certos patógenos bacterianos, a capacidade de formação de biofilmes é um fator determinante de virulência, essencial para a colonização e a persistência no hospedeiro (Parker et al., 2016). O biofilme é caracterizado por um aglomerado de células bacterianas (Pedersen et al., 2021) aderidas à superfície biótica ou abiótica, que estão embutidas em uma matriz composta predominantemente por polissacarídeos (Fabres-Klein et al., 2015). A formação de biofilme facilita a adesão das bactérias às superfícies biológicas, protegendo-as contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (Vanderhaeghen et al., 2014).

Acredita-se que a persistência de *Staphylococcus aureus* na glândula mamária esteja relacionada à capacidade do patógeno de formação de biofilme (Fabres-Klein et al., 2015; Abril et al., 2020). De maneira geral, esse biofilme representa uma barreira física e biológica, que reduz significativamente a efetividade do sistema imunológico inato, reduzindo sua eficácia. Além disso, ele contribui para a baixa eficácia dos tratamentos com antimicrobianos (Fabres-Klein et al., 2015; Ashraf; Imran, 2020).

A resposta inata influencia na severidade clínica, duração e ocorrência de novos casos de infecções intramamárias (Goulart; Mellata, 2022). Em síntese, outros micro-organismos como *Klebsiella* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* são capazes de formar biofilme (Pedersen et al., 2021). Apenas quando o tecido glandular sofre lesões mínimas, o processo de cura será bem-sucedido (Goulart; Mellata, 2022).

Portanto, a compreensão da estrutura populacional, dos mecanismos de transmissão e das características de virulência e patogenicidade dos micro-organismos associados à mastite é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle desses agentes nos rebanhos leiteiros (Morales-Ubaldo et al., 2023). Em síntese, a patogênese da mastite bovina envolve a interação complexa entre o agente patogênico, idade, sistema imunológico, fatores genéticos e estado nutricional do animal (Ashraf; Imran, 2020).

2.4 Classificação da mastite

A mastite é classificada como uma enfermidade associada à produção (Hogeveen et al., 2011), e se apresenta de forma clínica, subclínica e crônica (Cheng; Han, 2020). A mastite clínica se manifesta por sinais clínicos, incluindo edema, hiperemia, resistência do úbere e aumento da temperatura corporal (Vanderhaeghen et al., 2014). Provoca alterações da composição e aparência do leite (Tora; Bekele; Kumar, 2022), com presença de coágulos,

consistência aquosa e elevada CCS (Gad et al., 2025).

A ocorrência da mastite clínica está relacionada a fatores ligados ao animal, ao ambiente e ao patógeno (Tora; Bekele; Kumar, 2022). Patógenos ambientais, especialmente coliformes fecais, são reconhecidos como os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento da mastite clínica (Sharun et al., 2021). Esses casos clínicos são associados à alta gravidade e curta duração (Bertolini et al., 2022), podendo ser classificados em mastite hiperaguda, aguda e subaguda, dependendo do estado clínico e da gravidade dos sinais clínicos apresentados (Ashraf; Imran, 2020).

A mastite clínica resulta em morbidade e mortalidade significativa de vacas leiteiras (Tora; Bekele; Kumar, 2022), além de danificar as células secretoras de leite e reduzir a expectativa de vida dos animais acometidos (Azooz; El-Wakeel; Yousef, 2020). Alguns casos se resolvem espontaneamente, mas na maioria dos casos o uso de antimicrobianos é fundamental para a cura da doença (Pedersen et al., 2021). Embora os antimicrobianos tenham impacto limitado no controle profilático da doença, eles exercem um efeito significativo sobre o bem-estar animal e a rentabilidade do rebanho (Winder et al., 2019).

A mastite subclínica não apresenta alterações visíveis (Tora; Bekele; Kumar, 2022). É a forma mais prevalente, logo, atua como reservatório de patógenos e se manifesta a partir de um processo inflamatório assintomático (Gad et al., 2025). No entanto, a mastite subclínica é caracterizada por provocar mudanças na composição e qualidade do leite (Ashraf; Imran, 2020), pelo aumento da CCS e pela diminuição da produção (Vanderhaeghen et al., 2014; Tora; Bekele; Kumar, 2022).

A mastite subclínica provoca uma maior perda na produção leiteira comparada à mastite clínica (Sharun et al., 2021). Calcula-se que, para cada ocorrência de mastite clínica, existam de 15 a 40 casos de mastite subclínica nos rebanhos (Simões; De Oliveira, 2012). Estima-se que essa forma de mastite contribua com cerca de 60% a 70% das perdas econômicas totais associada às mastites de origem infecciosa (Schwarz et al., 2010).

A identificação da mastite subclínica é um desafio, mas o desenvolvimento de abordagens de triagem indireta auxilia no diagnóstico (Giagu et al., 2022). As infecções podem ser detectadas por testes moleculares, análise de amostras de leite, CCS e cultura bacteriológica (Simões; De Oliveira, 2012; Haine et al., 2018). A identificação do patógeno envolvido é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo e controle da enfermidade (Ashraf; Imran, 2020).

Alguns quadros de mastite persistente se tornam crônicos (Pedersen et al., 2021). A mastite crônica é descrita por um episódio inflamatório prolongado, com menor probabilidade

de recuperação completa, frequentemente associada a uma contagem elevada de células somáticas (Bonestroo et al., 2023). É frequentemente associada a infecções subclínicas que evoluem para estado crônico, causadas por patógenos de difícil erradicação, como *Staphylococcus aureus* (Fabres-Klein et al., 2015).

2.5 Métodos de diagnóstico.

O diagnóstico precoce é essencial para o desenvolvimento de um melhor tratamento (Ashraf; Imran, 2020). Os métodos de diagnóstico da mastite bovina variam desde técnicas simples de campo até procedimentos laboratoriais avançados, sendo importantes para observar a presença de infecção e para determinar o agente causador (Simões; De Oliveira, 2012; Giagu et al., 2022). O diagnóstico da mastite clínica é baseado na observação dos achados clínicos, normalmente o animal apresenta quadro de inflamação da glândula mamária, manifestando sintomas como dor, hiperemia, febre, indisposição e edema da glândula mamária (Vanderhaeghen et al., 2014; Panchal et al., 2024).

A aparência do leite também é alterada, dessa forma, o teste da caneca de fundo preto ou telada constitui uma ferramenta para o diagnóstico da mastite clínica. Na avaliação dos primeiros jatos de leite, podem ser identificadas características anormais, como a presença de coágulos, coloração amarelada, variações de consistência (aquosa a espessa), além de presença de pus ou sangue. Este método potencializa a detecção de alterações patológicas, permitindo uma intervenção imediata (Brasil, 2012; Massote et al., 2019; Campos et al., 2022; Gonçalves et al., 2023). O tratamento deve ser iniciado de forma imediata após o diagnóstico positivo, sendo orientado pela realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana (antibiograma) para garantir uma terapia direcionada (Langoni et al., 2017; Paiva, 2009).

A análise microbiológica das amostras de leite é imprescindível para o diagnóstico preciso da mastite. O procedimento inicia com o descarte dos primeiros jatos de leite e a desinfecção dos tetos, utilizando algodão embebido em álcool a 70%, seguido da coleta asséptica do leite em recipiente estéril. As amostras devem ser mantidas sob refrigeração (4–5°C) por até 24 horas ou, se inviável a entrega nesse período, congeladas por até quatro semanas, a fim de preservar sua integridade para análise. Os protocolos terapêuticos são elaborados com base na identificação do patógeno envolvido e na gravidade dos sintomas clínicos apresentados. Em casos de mastite subclínica associada a *Staphylococcus coagulase-negativa* (SNC) durante a lactação, o tratamento é geralmente adiado para o período seco (Paiva, 2009; De Oliveira et al., 2020).

A CCS no leite é um indicador crítico para avaliar a saúde da glândula mamária e o status sanitário do rebanho. Este parâmetro reflete a resposta inflamatória a infecções

intramamárias e pode ser analisado tanto individualmente (por quarto mamário) quanto coletivamente (tanque de resfriamento). Valores inferiores a 100.000 células/mL indicam quartos saudáveis, enquanto níveis acima de 300.000 células/mL sugerem infecção por patógenos. Faixas intermediárias (100.000–300.000 células/mL) podem sinalizar inflamação inicial ou infecções ambientais, exigindo monitoramento (Simões; De Oliveira, 2012; Massote et al., 2019; Sumon et al., 2020; Gonçalves et al., 2023).

O diagnóstico preliminar da mastite subclínica em condições de campo frequentemente emprega testes indiretos, como o *California Mastitis Test* (CMT) e *Wisconsin Mastitis Test* (WMT), que avaliam a viscosidade ou a formação de gel em amostras de leite, correlacionando-se com CCS como marcador de inflamação intramamária (Simões; De Oliveira, 2012). Embora esses métodos sejam rápidos, de baixo custo e amplamente utilizados, apresentam limitações inerentes, como sensibilidade variável (60-85%) e especificidade moderada (70-90%), podendo gerar falsos positivos devido à interferência de fatores como estágio de lactação ou estresse térmico. Falsos diagnósticos podem resultar em decisões inadequadas, como abate precoce dos animais ou uso indiscriminado de antimicrobianos, exacerbando custos produtivos e riscos de resistência bacteriana. (Mahmmod et al., 2013; Gad et al., 2025).

O CMT é um teste rápido e de baixo custo, amplamente utilizado para detectar mastite subclínica, sendo particularmente eficaz para infecções por *Staphylococcus aureus*. O teste consiste na mistura de volumes iguais de leite e um reagente à base de detergente, com os resultados interpretados de acordo com a formação de gel ou a viscosidade resultante. Os escores são categorizados como negativo, traços, leve (+), moderado (++) ou intenso (+++), correlacionando-se com a CCS. Os resultados negativos indicam a integridade dos quadrantes mamários, enquanto escores mais altos sugerem a presença de infecção subclínica (Zafalon et al., 2008; Massote et al., 2019; Oliveira et al., 2020; Cheng; Han, 2020).

O WMT é uma ferramenta diagnóstica quantitativa que supera a subjetividade associada ao CMT. Seu princípio metodológico baseia-se na análise espectrofotométrica da turbidez do leite após a adição de um reagente detergente, o qual dissolve os glóbulos de gordura e estabiliza a CCS por lise das membranas celulares. Contudo, sua aplicação em campo é limitada pela dependência de equipamentos como espectrofotômetro e de treinamento técnico. Esses requisitos restringem sua viabilidade em pequenas propriedades, tornando-o mais adequado para laboratórios ou fazendas de grande escala com infraestrutura adequada (Massote et al., 2019; Narváez-Semanate et al., 2022).

A condutividade elétrica do leite destaca-se como método eficaz para identificar

alterações iônicas associadas a processos inflamatórios. Complementarmente, técnicas como cultura bacteriológica, contagem bacteriana total, ensaios moleculares (PCR) e análises laboratoriais ampliam a precisão diagnóstica, permitindo a detecção de patógenos e avaliação da saúde do rebanho. (Simões; De Oliveira, 2012; Mahmmod et al., 2013; Giagu et al., 2022; Gad et al., 2025).

O diagnóstico molecular apresenta maior especificidade e sensibilidade em comparação com métodos convencionais de detecção. Logo, técnicas moleculares, incluindo fenotipagem e genotipagem, permitem a identificação rápida e específica de patógenos. Essas metodologias devem integrar rapidez, detecção precoce, precisão e viabilidade econômica, sendo essenciais em setores como a indústria leiteira, onde contribuem para a qualidade do produto, o controle de doenças e o bem-estar animal. Além disso, um diagnóstico abrangente requer a integração de abordagens clínicas e laboratoriais, assegurando a identificação tanto de manifestações clínicas quanto subclínicas, fundamentais para estratégias de vigilância sanitária e gestão de saúde animal (Ashraf; Imran, 2020; Sharun et al., 2021).

2.6 Tratamento

O tratamento da mastite bovina está direcionado tanto para a eliminação do agente causador, como para a mitigação dos danos provocados ao tecido mamário (Sharun et al., 2021; Cheng; Han, 2020). A terapia com antimicrobianos é a principal estratégia de tratamento e tem por principal objetivo levar à redução do processo infeccioso e a prevenção de novos casos de infecções da glândula mamária (Campos et al., 2022; Rodríguez et al., 2024).

O período de secagem, caracterizado pela ausência de lactação, constitui etapa importante para a saúde do úbere, representando a janela terapêutica mais eficaz para a remissão da mastite antes do próximo ciclo de lactação. Durante essa fase, a aplicação de protocolos terapêuticos específicos possibilita a erradicação de infecções subclínicas e a prevenção de novas infecções bacterianas. Além disso, ordenhar a vaca em período de lactação completamente para remover bactérias, coágulos de leite, detritos celulares e metabólitos bacterianos, estabelecendo condições microbiológicas e fisiológicas favoráveis à regeneração tecidual mamária (Winder et al., 2019; Cheng; Han, 2020; McMullen et al., 2021).

A terapia intramamária no período seco envolve a administração de antimicrobianos de ação prolongada e selantes intramamários, os quais atuam sinergicamente na contenção de patógenos e na barreira física contra novos micro-organismos. Ressalta-se, contudo, que a utilização de antimicrobianos de liberação prolongada é contraindicada durante a lactação, devido aos riscos de persistência de resíduos de antibióticos no leite e à seleção de cepas resistentes aos antibióticos. Adicionalmente, a adoção de terapia seletiva para vacas em

ausência de lactação, combinada com o descarte de vacas cronicamente infectadas, configura estratégia epidemiológica eficiente na redução da carga de patógenos contagiosos no rebanho (Bradley, 2002; Klaas; Zadoks, 2017; Lagoni et al., 2017; Winder et al., 2019; Cheng; Han, 2020; McMullen et al., 2021; Sharun et al., 2021; Campos et al., 2022).

As estratégias de tratamento da mastite se apresentam de forma diversificada em todo o mundo (Wilm et al., 2024), desde utilização de antimicrobianos, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (Klaas; Zadoks, 2017), compostos derivados de plantas e animais (Cheng; Han, 2020), peptídeos antimicrobianos (Popitool et al., 2023), óleos essenciais (Lopes et al., 2020), bacteriófagos, citocinas, ozonioterapia (Tomanić; Samardžija; Kovačević, 2023), inativação fotodinâmica (Selerra et al., 2026) e vacinação como estratégia de tratamento preventivo (Sharun et al., 2021).

A seleção dos antimicrobianos deve levar em conta a presença de resistência bacteriana, tornando essencial o desenvolvimento de teste de sensibilidade para identificar o tratamento mais eficaz (Haine et al., 2018). Diante disso, a utilização de agentes antimicrobianos ineficazes apresenta pouco impacto no controle da enfermidade (Winder et al., 2019). Por conseguinte, a resistência apresentada pelos agentes da mastite levou à diminuição da resposta apresentada pela antibioticoterapia convencional (Benites et al., 2021; Sharun et al., 2021).

As cefalosporinas de terceira e quarta geração, como o Ceftiofur e o Cefquinoma, demonstram maior eficácia terapêutica frente às formulações convencionais da classe, destacando-se na redução da carga bacteriana e na biodisponibilidade intramamária (Klaas; Zadoks, 2017), embora as cefalosporinas de primeira geração ainda sejam as mais utilizadas na prática clínica, devido à sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e ao custo relativamente menor (Winder et al., 2019). Os antimicrobianos sistêmicos desempenham um melhor resultado na eliminação do processo de inflamação da glândula mamária e casos graves são tratados com antibióticos de amplo espectro de ação. Adicionalmente, moléculas como penicilina, ampicilina, tetraciclina, gentamicina permanecem em uso, desde que respaldadas por teste de sensibilidade, assim como estratégias de tratamento coletivo do rebanho (Bradley, 2002; Klaas; Zadoks, 2017; Winder et al., 2019; Cheng; Han, 2020).

Diante do cenário global de resistência antimicrobiana (RAM), investigações têm focado no desenvolvimento de alternativas terapêuticas sustentáveis. Os peptídeos antimicrobianos de origem sintética ou natural emergem como candidatos promissores, exibindo atividade bactericida de amplo espectro contra Gram-positivas e Gram-negativas, além de baixo potencial indutor de resistência. Paralelamente, estudos *in vitro* e *in vivo*

demonstram que óleos essenciais derivados de *Thymus vulgaris* e *Lavandula angustifolia* apresentam atividade bacteriostática e bactericida frente a *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., com redução significativa na contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) no leite após protocolos de aplicação continuada (Lopes et al., 2020; Popitool et al., 2023; Kaseke et al., 2023).

Entre as abordagens emergentes, destacam-se a terapia com bacteriófagos, antimicrobianos de origem animal e a suplementação com probióticos. Os bacteriófagos são vírus capazes de infectar e destruir bactérias específicas, reduzindo sua proliferação e preservando a microbiota comensal. Além disso, a fitoterapia se destaca como alternativa economicamente viável, com perfis farmacológicos associados à baixa toxicidade e menor pressão evolutiva para resistência. Contudo, a eficácia de compostos fitoterápicos e homeopáticos no contexto de mastite bovina necessita de mais pesquisas para sua aprovação científica (Lagoni et al., 2017; Tomanić; Samardžija; Kovačević, 2023; Kaseke et al., 2023).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) surge como alternativa promissora no controle de infecções bacterianas, baseada na geração de ERO, tem se apresentado eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de micro-organismos multirresistentes, sem relatos de resistência. Para otimizar o manejo da mastite, recomenda-se a integração de estratégias como diagnóstico precoce, descarte sanitário de animais com infecções recorrentes e adoção de terapias complementares não antimicrobianas. Tais medidas convergem para um controle mais sustentável da doença (Selerra et al., 2016; Campos et al., 2022).

Em resumo, o manejo terapêutico da mastite clínica requer intervenção imediata após o diagnóstico, a fim de promover a rápida erradicação do agente infeccioso e preservação da integridade do tecido mamário. Por outro lado, infecções subclínicas devem ser tratadas preferencialmente no período de secagem, devido ao risco de persistência de resíduos antimicrobianos no leite durante a lactação. Diante da natureza multifatorial da enfermidade, estratégias preventivas como higiene rigorosa, monitoramento de células somáticas e manejo sanitário consolidam-se como medidas mais eficazes para controle epidemiológico. Nesse contexto, o aumento global da RAM, impulsionado pelo uso inadequado de fármacos, emerge como desafio crítico à saúde animal e pública (Brasil, 2012; Kibebew, 2017; Campos et al., 2022).

No quadro 1, podemos observar os principais tratamentos convencionais utilizados no controle da mastite bovina, baseados na utilização de antimicrobianos e o perfil de resistência apresentado pelos principais patógenos.

Quadro 1 - Características de resistência de patógenos bacterianos contagiosos e ambientais associados à mastite bovina. Adaptado (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Agente	Características de virulência	Perfil de resistência antimicrobiana	Genes de resistência antimicrobiana
<i>S. agalactiae</i>	Formação de biofilme, Cps, cylE, CAMP, cfa/cfb, hylB, cylE, iagA, bac, fbsA, fbsB, PI-2a, PI-2b, PI-1, pau-A, ÿ enolase, hialuronato liase	Amoxicilina Ceftazidima Ceftriaxona Penicilina Piperacilina	mprF, mreA, TEM
<i>S. aureus</i>	Formação de biofilme, cápsulas, Panton-Leucocidina Valentine, Toxina-1 da síndrome do choque tóxico, Genes de cluster de evasão imune, tipo E, produção de lodo	Amoxicilina Cefoxitina Ciprofloxacina Clidamicina Eritromicina Gentamicina Oxacilina Oxitetraciclina Penicilina Sulfametoxazol Tetraciclina Trimetoprima Vancomicina	blaZ, tetM, tetK, tetL, mecA, mecC, spa fragment, icaA, icaD
<i>M. bovis</i>	Adesinas, prevenção da fagocitose, formação de biofilme, produção de peróxido de hidrogênio	Canamicina Oxitetraciclina Tilmicosina Tilosina Florfenicol Tiamulina Enrofloxacina	
<i>E. coli</i>	LpfA, Iss, astA, f17A, irp2, iucD, colV, papC	Amicacina Ampicilina Carbenicilina Cefoxitina Ceftriaxona Cefalotina Cloranfenicol Ciprofloxacina Doxiciclina Eritromicina Gentamicina Lincomicina Nitrofurantoína Oxacilina Oxitetraciclina Penicilina Estreptomicina Sulfametoxazol Tetraciclina Vancomicina	tetM, tetL, tetA, blaZ, blaEc, ampC, aadA, sul2, strA, strB, sul1, sul3, blaCTX- M-1, blaCTX- M-9, blaCTX- M-28, blaCTX- M-14

Agente	Características de virulência	Perfil de resistência antimicrobiana	Genes de resistência antimicrobiana
<i>K. pneumoniae</i>	EntB, FimH, Kfu, MrkD, β -D-lacZ, ituA, allS	Amoxicilina	TetA, TetB, OqxAB, qnrB1, sul1, sul2, strA, strB, aadA, blaCTX-M-15, AmpH, blaSHV-12, blaTEM, fosA, fosA5, fosA6, mcr-10, dfrA14
		Ampicilina	
		Cefazolina	
		Cefotaxima	
		Cefoxitina	
		Ceftazidima	
		Ceftriaxona	
		Cloranfenicol	
		Colistina	
		Enrofloxacina	
		Fosfomicina	
		Gentamicina	
		Canamicina	
		Neomicina	
		Piperacilina – tazobactam	
		Espectinomicina	
		Sulfisoxazol	
		Sulfonamidas	
		Tetraciclina	
Tigeciclina			
Trimetoprima Tilosina			
<i>S. uberis</i>	Produção de biofilme, gapC, oppF, pauA (skc), sua, hasC, mtuA	Amicacina	LinB, ErmB, tetS
		Amoxicilina	
		Ceftazidima	
		Ceftriaxona	
		Cefalotina	
		Enrofloxacina	
		Eritromicina	
		Gentamicina	
		Lincomicina	
		Penicilina	
		Piperacilina	
		Rifampicina	
		Espectinomicina	
Estreptomicina			
Tetraciclina			

2.7 Prevenção e controle

Diversas medidas têm sido propostas para o controle e a prevenção da mastite bovina em rebanhos leiteiros (Campos et al., 2022). Como estratégia inicial, recomenda-se a avaliação regular do úbere durante a ordenha (Kibebew, 2017). Outras práticas importantes incluem, a lavagem adequada dos úberes sujos, a retrolavagem do condutor de leite após a ordenha (Hogeveen et al., 2011), bem como a estimulação dos tetos e o tempo adequado durante o período de ordenha (Campos et al., 2022) são medidas profiláticas que auxiliam na proteção contra o surgimento precoce da mastite.

Ademais, identificar e tratar casos clínicos, eliminar casos crônicos e realizar

manutenção rotineira de máquinas de ordenha auxiliam no controle eficaz da doença no rebanho leiteiro (Cheng; Han, 2020). O ambiente onde as vacas são mantidas também tem um efeito decisivo sobre a saúde e bem-estar animal, logo a falta de higiene adequada está diretamente associada a um maior risco de ocorrência de mastite bovina (Kibebew, 2017).

Fatores como nutrição, resistência imunológica do hospedeiro, condições ambientais, técnicas aplicadas durante o processo de ordenha e a higiene geral estão intimamente ligados ao risco do desenvolvimento de mastite (Nakada et al., 2023). Dessa forma, o monitoramento adequado dos equipamentos de ordenha, a utilização de luvas pelos profissionais durante o processo de ordenha e a secagem dos tetos com uso de toalhas individuais são medidas profiláticas recomendadas contra o desenvolvimento da mastite no rebanho (Campos et al., 2022).

O uso de antibióticos para tratamento de vacas infectadas, aliado à remoção dos rebanhos de vacas infectadas, tem se mostrado uma estratégia eficaz no controle da mastite bovina (Rodríguez et al., 2024). Além disso, manter as vacas em pé após a ordenha (Hogeveen et al., 2011), melhorar a higiene durante o período seco (Kibebew, 2017) realizar a desinfecção adequada dos tetos após a ordenha são práticas que podem diminuir a transmissão de patógenos contagiosos (Deng et al., 2021), protegendo vacas saudáveis de vacas infectadas (Cheng; Han, 2020). Por conseguinte, a manutenção das camas limpas e secas, a ventilação adequada dos ambientes, a antisepsia dos tetos antes e após a ordenha, bem como a utilização de vacinas profiláticas (Campos et al., 2022) são medidas que auxiliam na proteção do rebanho.

A vacinação tem como principal objetivo prevenir infecções nos rebanhos contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*. Embora a vacinação tenha sido incorporada como ferramenta profilática, evidências apontam que, isoladamente, ela não atinge níveis ótimos de prevenção, necessitando da implementação de medidas preventivas para o controle e manejo sanitário, de forma a resultar menores perdas econômicas associadas à enfermidade (Hogeveen et al., 2011; Cheng; Han, 2020; Rainard et al., 2021).

As vacinas direcionadas a patógenos específicos; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, têm sido desenvolvidas com a finalidade de reduzir tanto a incidência quanto a severidade das infecções intramamárias. Em específico, formulações baseadas em cepas de *Escherichia coli* e conhecidas como J5 apresentam eficácia significativa, promovendo uma resposta imune robusta que acelera a eliminação do patógeno e minimiza os quadros clínicos apresentados (Brasil, 2012; Tomanić; Samardžija; Kovačević, 2023).

A efetividade da vacinação depende intrinsecamente de fatores como formulação, via de administração, qualidade do imunizante e cobertura adequada. Estudos indicam que, enquanto a vacinação com cepas específicas, como *Staphylococcus aureus* SP140, induz uma resposta imune mais potente na eliminação do patógeno da glândula mamária em relação aos animais não vacinados, a administração via subcutânea e a associação com tratamentos antimicrobianos podem aprimorar a resposta imunológica, reduzindo a gravidade dos quadros inflamatórios mesmo que a incidência total de mastite não seja significativamente alterada, o que justifica os gastos com a vacinação (Lagoni et al., 2017; Klaas; Zadoks, 2017; Tomanić; Samardžija; Kovačević, 2023).

Portanto, a vacinação preventiva contra *Staphylococcus aureus* tem sido indicada, devido à sua alta prevalência nos rebanhos leiteiros e à alta dificuldade apresentada pelo patógeno aos tratamentos convencionais, a vacinação aumenta a taxa de cura espontânea e diminui a gravidade das infecções. É notório que a vacinação contra mastite, seja considerada uma ferramenta complementar no combate à resistência bacteriana, inserida em um conjunto de práticas de manejo e controle sanitário, visando a redução da gravidade dos sinais clínicos e prejuízos econômicos que estão associados à doença (Brasil, 2012; Klaas; Zadoks, 2017).

2.8 Impactos na saúde pública

A mastite bovina, além de ser uma enfermidade que proporciona impactos negativos na produção leiteira, ameaça de forma direta a saúde pública (Ashraf; Imran, 2020). O consumo de leite contaminado com antibióticos e bactérias, proporciona intoxicação alimentar (Kibebew, 2017), transmissão de patógenos zoonóticos (Goulart; Mellata, 2022), reações alérgicas quando consumido por indivíduos sensíveis (Ashraf; Imran, 2020), além de favorecer o aumento da RAM (Pedersen et al., 2021).

A RAM é um desafio à saúde humana e animal, está diretamente associada ao uso inadequado de antimicrobianos no tratamento da mastite, como a administração sem diagnóstico preciso, dosagens incorretas, tempo de tratamento inadequado ou escolhas de fármacos ineficientes (Bradley, 2002; Petersen et al., 2021). Evidências demonstram que a escolaridade dos produtores influencia práticas sanitárias; produtores com baixa formação tendem a ignorar períodos de carência, não descartar leite contaminado e negligenciar equipamentos de proteção individual (EPIs), ampliando riscos de resíduos farmacológicos no leite. Em contrapartida, produtores com ensino superior e maior volume produtivo (>500 litros/dia) adotam condutas seguras, como descarte adequado e participação de treinamentos técnicos. Assim, políticas públicas que integrem educação sanitária, capacitação técnica e monitoramento rigoroso são fundamentais para reduzir a pressão seletiva da RAM nos rebanhos

(Borsanelli et al., 2014).

A presença de contaminação bacteriana no leite torna-o impróprio para o consumo humano (Kibebew, 2017). O leite mastítico é fonte de contaminação e de patógenos com RAM (Ashraf; Imran, 2020). O consumo do leite com resíduos de antibióticos após o tratamento da mastite pode resultar em respostas alérgicas, alterações na microbiota intestinal e desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos (Kibebew, 2017). A contaminação afeta negativamente a qualidade do leite, com alterações físicas, químicas, bacteriológicas e organolépticas (Ashraf; Imran, 2020).

As cepas resistentes podem ser transmitidas para os humanos (Ashraf; Imran, 2020), pois espécies de micro-organismos agentes da mastite, como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *Staphylococcus aureus*, podem ser consideradas zoonoses (Kibebew, 2017). Algumas espécies de bactérias têm capacidade de produzir enzimas termo resistentes, que não são tóxicas necessariamente por si só, mas são consideradas fatores de risco à saúde humana por contribuírem para a persistência bacteriana e a degradação de alimento, mesmo após o processo térmico (Simões; De Oliveira, 2012). O risco à saúde está diretamente relacionado ao consumo de produtos lácteos não pasteurizados ou com falha na pasteurização, pois este processo pode inativar tanto os patógenos quanto toxinas (Bradley, 2002).

O surgimento de bactérias multirresistentes (MDR), especialmente o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), representa uma preocupação crescente tanto na saúde humana quanto no animal. Este patógeno, originalmente associado a ambientes hospitalares, tem sido identificado em animais, evidenciando um potencial zoonótico e o risco de transmissão entre espécies. A presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PLP2a) com afinidade reduzida pelos antimicrobianos beta-lactâmicos, é o principal mecanismo responsável pela resistência observada, tornando o MRSA resistente a uma ampla gama de antibióticos, incluindo todas as penicilinas, cefalosporinas e outros beta-lactâmicos de uso clínico (Dorneles et al., 2019; Silva et al., 2021; Benites et al., 2021; Cunha et al., 2022; Santos et al., 2023).

A resistência conferida pelo gene *mecA* impacta significativamente o tratamento de infecções, como a mastite bovina, uma vez que os antibióticos beta-lactâmicos são frequentemente empregados na terapêutica em rebanhos leiteiros. Essa resistência não se restringe apenas aos beta-lactâmicos; os micro-organismos multirresistentes também apresentam elevada resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e outros agentes antimicrobianos, o que dificulta a erradicação das infecções e impõe desafios para o manejo clínico (Zafalon et al., 2008; Lopes et al., 2020; Silva et al.,

2021; Pachal et al., 2024).

Outro fator relevante é o papel dos cassetes cromossômicos, conhecidos como SCCmec, que abrigam o gene *mecA* e suas variantes (incluindo *mecC*). A evolução destes elementos genéticos, ocorrida inicialmente na década de 1960, contribuiu para a emergência e disseminação de isolados multirresistentes, evidenciando um processo adaptativo que favoreceu a persistência do MRSA em ambientes tanto hospitalares quanto comunitários e na produção animal (Martins et al., 2010; Dorneles et al., 2019; Lopes et al., 2020; Silva et al., 2021 2).

A disseminação do MRSA em ambientes rurais, com relatos de sua presença nas narinas e mãos de ordenhadores, bem como em utensílios utilizados durante a ordenha, reforça a necessidade de vigilância sanitária e de práticas rigorosas de controle da higiene e do uso de antimicrobianos. Essas medidas são essenciais para reduzir o risco de transmissão entre animais e humanos, promovendo uma abordagem integrada da saúde, como a proposta pela estratégia Saúde Única (Silva et al., 2021; Gonçalves et al., 2022; Freu et al., 2022).

Nesse contexto, a saúde pública não deve ser negligenciada, pois a implementação da abordagem Saúde Única da Organização Mundial da Saúde, cujo objetivo é melhorar o bem-estar animal, segurança alimentar e promover a saúde humana, se mostra essencial para investigação da transmissão e controle de doenças (Bradley, 2002; Campos et al., 2022). A Figura 1 representa um esquema da abordagem Saúde Única, na interseção saúde animal, saúde humana e saúde ambiental.

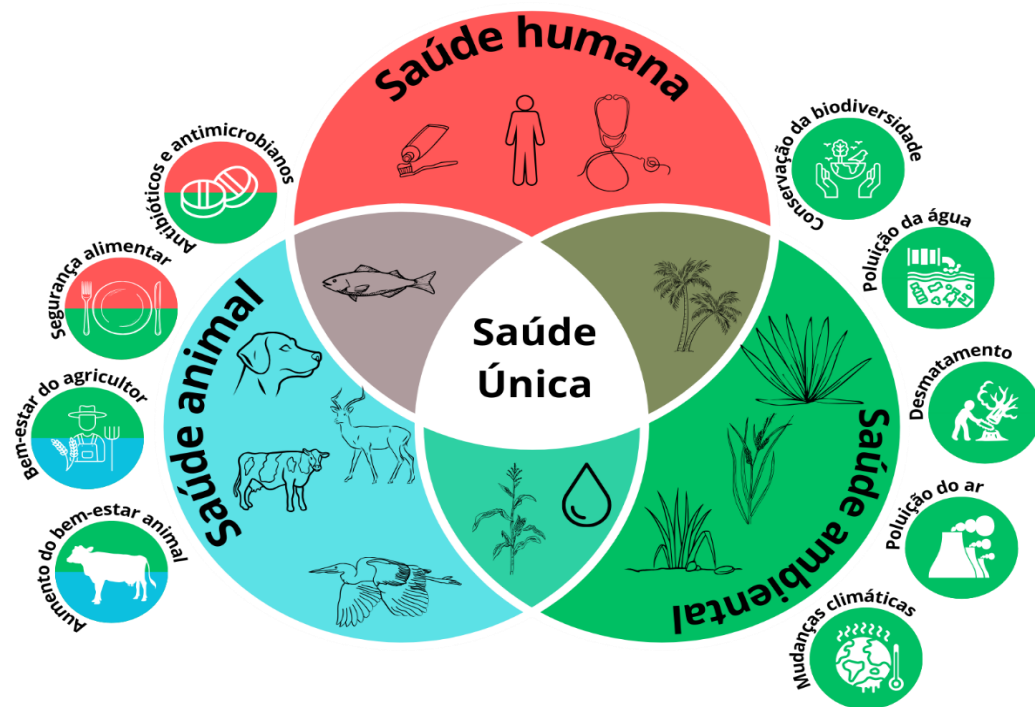


Figura 1 - Abordagem Saúde Única. A figura representa a aplicabilidade da abordagem Saúde Única para manter a complexa interligação entre o bem-estar animal, humano e ambiental. Adaptado (Maity; Ambatipudi, 2021).

Em resumo, o controle eficaz da doença, por meio de práticas de manejo adequadas, utilização de tratamentos específicos e medidas preventivas, é fundamental para minimizar os riscos de contaminação do leite por patógenos, reduzir o uso inadequado de antimicrobianos e assegurar a produção de um alimento de qualidade (Cheng; Han, 2020; Kibebew, 2017).

2.9 Inativação fotodinâmica

2.9.1 Mecanismos de ação da Inativação Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica terapêutica que utiliza a combinação de fotossensibilizadores (FSs), luz visível com comprimento de onda específico e oxigênio molecular, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que causam danos irreversíveis em células-alvo. Inicialmente desenvolvida para o tratamento de câncer, sua aplicação expandiu-se para áreas como microbiologia, controle de infecções e agricultura, destacando-se como alternativa promissora frente à crescente RAM (Rolim et al., 2012; Couto et al., 2020; Rodrigues et al., 2022).

A TFD baseia-se em mecanismos físico-químicos nos quais o FS, após absorver energia luminosa, é excitado para estados energéticos superiores (singleto S_1 e tripleto T_1). No estado tripleto, o FS interage com o oxigênio molecular por meio de dois mecanismos principais: reações tipo I, envolvendo transferência de elétrons e formação de espécies citotóxicas, como radicais superóxido, hidroxila e hidroperóxido, e reações tipo II, com geração

de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), espécie altamente reativa. Essas ERO promovem danos oxidativos irreversíveis em lipídios, proteínas, DNA e estruturas de membrana, levando à morte celular rápida e não seletiva (Rolim et al., 2012; Hasegawa et al., 2015; Junior et al., 2019).

2.9.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem se destacado pelo seu amplo espectro de ação, atuando contra uma gama de micro-organismos, como fungos, vírus, parasitas e bactérias, e apresentando um potencial promissor no enfrentamento de diversas doenças infecciosas. Seu mecanismo de ação, que atinge múltiplos alvos, reduz significativamente a chance de desenvolvimento de resistência microbiana, pois a fotoinativação gera danos irreversíveis em componentes essenciais das células (Hamblin; Hasan, 2004; Wozniak et al., 2019; Almeida, 2020; Chen et al., 2024).

A TFDa nem sempre proporciona a redução completa da microbiota, no entanto, reduz de forma significativa a carga microbiana, permitindo assim uma combinação com terapias complementares que pode aumentar a eficácia terapêutica. No caso das bactérias, existe uma diferença na membrana que influencia na susceptibilidade à TFDa. As bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis que bactérias Gram-positivas, devido à presença de membrana externa e sistemas de efluxo. As ERO geradas durante a técnica podem aumentar a permeabilidade da parede bacteriana, destruir fatores de virulência, como enzimas, toxinas e pequenas moléculas (Hamblin; Hasan, 2004; Sellera et al., 2016; Fekrazad et al., 2016).

Dentre as diversas aplicações dessa técnica, a mastite bovina representa um dos campos mais desafiadores e promissores. Estudos recentes têm demonstrado que a terapia fotodinâmica pode reduzir consideravelmente a carga bacteriana associada a essa infecção. Os fotossensibilizadores, como o azul de metileno e o azul de toluidina, são os mais empregados nessa abordagem, devido à sua baixa toxicidade e alta eficácia na erradicação dos micro-organismos envolvidos na mastite. Além disso, a TFDa tem a capacidade de aumentar a permeabilidade das células bacterianas, o que potencializa a ação sinérgica de antibióticos e auxilia na remoção de biofilmes formados por esses patógenos (Sellera et al., 2016; Fekrazad et al., 2016).

Apesar dos avanços, a aplicação da inativação fotodinâmica na mastite ainda enfrenta desafios práticos, como os sólidos suspensos no leite que criam uma barreira física à luz. A estrutura celular robusta apresentada por bactérias gram-negativas, que limita a penetração dos agentes fotossensibilizadores, e a baixa solubilidade em água dos FSs que dificulta administrações *in vivo*. Esses fatores ressaltam a necessidade de desenvolver novas formulações e protocolos que melhorem a biodisponibilidade e a eficácia do tratamento. Mesmo assim, a

abordagem TFDa apresenta-se como uma alternativa promissora, exibindo ausência de efeitos mutagênicos e reduzida probabilidade de seleção de cepas resistentes, o que a torna uma alternativa valiosa aos tratamentos antimicrobianos convencionais (Sellera et al., 2016; Moreira et al., 2018; Couto et al., 2020).

2.10 Avanços recentes e perspectivas futuras

As aplicações da TFDa são vastas e multidisciplinares. Na medicina veterinária, é utilizada para reduzir a carga bacteriana no leite, enquanto na odontologia, controla biofilmes em cáries e periodontite, na medicina humana é empregada no tratamento oncológico e na indústria alimentícia, destaca-se como método não térmico. A capacidade de erradicar patógenos MDR e protozoários, aliada à ausência de efeitos mutagênicos acumulativos, reforça seu potencial como ferramenta profilática e terapêutica (Jori et al., 2006; Garcez et al., 2013; Foggiato et al., 2018; Couto et al., 2020; Wozniak et al., 2021).

A encapsulação de FSs em nanoestruturas, como nanopartículas direcionadas por anticorpo, tem demonstrado precisão elevada em modelos de tumores. A capsulação de FSs, com sistemas conjugados com transportadores específicos, potencializa a produção de ERO e a localização de alvos específicos. Essa abordagem melhora o rendimento fotodinâmico, como também diminui danos colaterais aos tecidos saudáveis que estão ao redor da região (Jori et al., 2006; Almeida, 2020). A terapia combinada mostra-se promissora na destruição de micro-organismos resistentes e fatores de virulência. Esse mecanismo de sinergia possibilita uma melhor resposta terapêutica contra micro-organismos multirresistentes (Wozniak et al., 2019; Couto et al., 2020; Sivasubramanian et al., 2024).

Fora do ambiente clínico, a TFDa se apresenta como uma alternativa não térmica altamente eficiente na desinfecção de alimentos, água e superfícies, de forma a inativar micro-organismos sem comprometer a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (Jori et al., 2006; Couto et al., 2020). E, por último, o desenvolvimento de novos FSs, como, por exemplo, clorina e ftalocianinas, que permitem maior penetração tecidual, apresentando estabilidade melhorada que facilita sua utilização em tratamentos oncológicos de tumores profundos (Benov, 2015). Em síntese, a integração desses quatro tópicos projeta um futuro em que a TFDa se consolida como uma ferramenta multifacetada, capaz de atender diferentes demandas com alta eficácia, precisão e escala.

REFERÊNCIAS

- I.R. Dohoo, J. Smith, S. Andersen, D.F. Kelton, S. Godden, Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample, *J Dairy Sci* 94 (2011) 250–261. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3559>.
- V. Pereira Massote, B.M. Zanateli, G.V. Alves, E.S. Gonçalves, E. Guedes, DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE MASTITE BOVINA: uma revisão de literatura, n.d.
- H. Hogeveen, K. Huijps, T.J.G.M. Lam, Economic aspects of mastitis: New developments, *N Z Vet J* 59 (2011) 16–23. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>.
- T.C.F. Carvalho-Sombra, D.D. Fernandes, B.M.O. Bezerra, D.C.S. Nunes-Pinheiro, Systemic inflammatory biomarkers and somatic cell count in dairy cows with subclinical mastitis, *Vet Anim Sci* 11 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100165>.
- W.N. Cheng, S.G. Han, Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review, *Asian-Australas J Anim Sci* 33 (2020) 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>.
- H. Langoni, A. Salina, G.C. Oliveira, N.B. Junqueira, B.D. Menozzi, S.F. Joaquim, Considerações sobre o tratamento das mastites I, *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37 (2017) 1261–1269. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>.
- S. Barberato-Filho, C. de Cássia Bergamaschi, F. de Sá Del Fiol, F.B. Antoniazzi, J.M. Stievano, A.C. Justo, C. de Paula Souza, M.T. Silva, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Americas: Systematic review and metanalysis of prevalence in food-producing animals, *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health* 44 (2020). <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.48>.
- K. Sharun, K. Dhama, R. Tiwari, M.B. Gugjoo, M. Iqbal Yattoo, S.K. Patel, M. Pathak, K. Karthik, S.K. Khurana, R. Singh, B. Puvvala, Amarpal, R. Singh, K.P. Singh, W. Chaicumpa, Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review, *Veterinary Quarterly* 41 (2021) 107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>.
- C.H. Rodrigues, E.A.G. Araújo, R.P. Almeida, T.P. Nascimento, M.M. Silva, G. Abbas, F.D. Nunes, E. Lins, M.C.B. Lira-Nogueira, J.S.A. Falcão, A. Fontes, A.L.F. Porto, G. Pereira, B.S. Santos, Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102315>.
- F.P. Sellera, C.P. Sabino, M.S. Ribeiro, R.G. Gargano, N.R. Benites, P.A. Melville, F.C. Pogliani, In vitro photoinactivation of bovine mastitis related pathogens, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 13 (2016) 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.08.007>.
- G.K. Couto, F.K. Seixas, B.A. Iglesias, T. Collares, Perspectives of photodynamic therapy in biotechnology, *J Photochem Photobiol B* 213 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112051>.
- K.M. Alves, J. Honorato, L.M. Lião, V.S. Velozo-Sa, A.P.M. Guedes, J.D.L. Dutra, A.P.

Ayalla, J. Ellena, A.A. Batista, P.J. Gonçalves, Meso -Tetra-(4-pyridyl)porphyrin/palladium(ii) complexes as anticancer agents, *Dalton Transactions* 50 (2021) 16254–16264. <https://doi.org/10.1039/d1dt01850g>.

I.E. Borissevitch, P.J. Gonçalves, L.P. Ferreira, A.A. Kostyukov, V.A. Kuzmin, Characterization of Triplet State of Cyanine Dyes with Two Chromophores Effect of Molecule Structure, *Technologies (Basel)* 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/technologies11040090>.

I.E. Borissevitch, E. Silveira-Alves, C.G.L. Almeida, G.R.L. Souza, S.S. Sokolov, P.J. Gonçalves, An Alternative Method to Determine the Quantum Yield of the Excited Triplet State Using Laser Flash Photolysis, *Photonics* 10 (2023). <https://doi.org/10.3390/photonics10040409>.

M. Korínek, R. Dědic, A. Molnár, A. Svoboda, J. Hála, A comparison of photosensitizing properties of meso-tetraphenylporphin in acetone and in dimethyl sulfoxide, in: *J Mol Struct*, 2005: pp. 727–731. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.036>.

M.P.. Weinstein, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

A. Woźniak, N. Burzyńska, I. Zybala, J. Empel, M. Grinholc, Priming effect with photoinactivation against extensively drug-resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*, *J Photochem Photobiol B* 235 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112554>.

A. Wozniak, A. Rapacka-Zdonczyk, N.T. Mutters, M. Grinholc, Antimicrobials are a photodynamic inactivation adjuvant for the eradication of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Front Microbiol* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00229>.

A.B. de Freitas, H.H.A. Rezende, G.R.L. de Souza, P.J. Gonçalves, Photodynamic inactivation of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* difficult-to-treat resistance (DTR) by a cationic porphyrin, *J Photochem Photobiol B* 265 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2025.113133>.

K. Kalyanasundaram, Photochemistry of Water-Soluble Porphyrins: Comparative Study of Isomeric Tetrapyrrolyl- and Tetrakis (N-Methylpyridiniumyl) porphyrins, (n.d.). <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

D.-J. Qian, A. Planner, J. Miyake, D.F. Frackowiak, Photothermal effects and fluorescence spectra of tetrapyrrolylporphyrins, 2001.

A. Farmilo, F. Wilkinson, TRU'LEIX STATE QUENCHTNG BY FERROCENE, n.d.

J.I. Mapley, P. Hayes, D.L. Officer, P. Wagner, K.C. Gordon, Investigation of Ferrocene Linkers in β -Substituted Porphyrins, *Journal of Physical Chemistry A* 124 (2020) 5513–5522. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c00786>.

H. Mansour, M.E. El-Khouly, S.Y. Shaban, O. Ito, N. Jux, Synthesis and photophysical studies of porphyrin-ferrocene conjugates, 2007. www.worldscientific.com.

D. Haine, I. Dohoo, D. Scholl, S. Dufour, Diagnosing intramammary infection: Controlling misclassification bias in longitudinal udder health studies, *Prev Vet Med* 150 (2018) 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.11.010>.

C.B. Winder, J.M. Sargeant, D. Hu, C. Wang, D.F. Kelton, S.J. Leblanc, T.F. Duffield, J. Glanville, H. Wood, K.J. Churchill, J. Dunn, M.D. Bergevin, K. Dawkins, S. Meadows, B. Deb, M. Reist, C. Moody, A.M. O'Connor, Comparative efficacy of antimicrobial treatments in dairy cows at dry-off to prevent new intramammary infections during the dry period or clinical mastitis during early lactation: A systematic review and network meta-analysis, *Anim Health Res Rev* 20 (2019) 199–216. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000239>.

F.C. Campos, I.G. Castilho, B.F. Rossi, É.C.R. Bonsaglia, S.T.A. Dantas, R.C.B. Dias, A. Fernandes Júnior, R.T. Hernandez, C.H. Camargo, M.G. Ribeiro, J.C.F. Pantoja, H. Langoni, V.L.M. Rall, Genetic and Antimicrobial Resistance Profiles of Mammary Pathogenic *E. coli* (MPEC) Isolates from Bovine Clinical Mastitis, *Pathogens* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/pathogens11121435>.

Z. Rodriguez, V.E. Cabrera, H. Hogeveen, P.L. Ruegg, Economic impact of subclinical mastitis treatment in early lactation using intramammary nisin, *J Dairy Sci* 107 (2024) 4634–4645. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24311>.

Z. Deng, G. Koop, H. Hogeveen, E.A.J. Fischer, B.H.P. van den Borne, R. van der Tol, T.J.G.M. Lam, Transmission dynamics of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in a Dutch dairy herd using an automatic milking system, *Prev Vet Med* 192 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105384>.

M.H. Fabres-Klein, M.J. Caizer Santos, R. Contelli Klein, G. Nunes de Souza, A. de Oliveira Barros Ribon, An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*, *BMC Vet Res* 11 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0319-7>.

T.S. Lopes, P.S. Fontoura, A. Oliveira, F.A. Rizzo, S. Silveira, A.F. Streck, Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis, *Res Vet Sci* 131 (2020) 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>.

J. Panchal, A. Patel, S. Patel, D. Goswami, Understanding mastitis: Microbiome, control strategies, and prevalence – A comprehensive review, *Microb Pathog* 187 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106533>.

A.B. Bertolini, A.M. Prado, P.J. Thyssen, M. de Souza Ribeiro Mioni, F.L.R. de Gouvea, D. da Silva Leite, H. Langoni, J.C. de Figueiredo Pantoja, V.M. Rall, F.F. Guimarães, S.F. Joaquim, S.T. Guerra, R.T. Hernandez, S.B. Lucheis, M.G. Ribeiro, Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment, *Lett Appl Microbiol* 75 (2022) 1232–1245. <https://doi.org/10.1111/lam.13791>.

E.T. Tora, N.B. Bekele, R.S.S. Kumar, Bacterial profile of bovine mastitis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis, *PeerJ* 10 (2022). <https://doi.org/10.7717/peerj.13253>.

M.F. Azooz, S.A. El-Wakeel, H.M. Yousef, Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms, *Vet World* 13 (2020) 1750–1759. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1750-1759>.

C.H. Rodrigues, E.A.G. Araújo, R.P. Almeida, T.P. Nascimento, M.M. Silva, G. Abbas, F.D. Nunes, E. Lins, M.C.B. Lira-Nogueira, J.S.A. Falcão, A. Fontes, A.L.F. Porto, G. Pereira, B.S. Santos, Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102315>.

R. Combuca da Silva Junior, K. da Silva Souza Campanholi, F.A. Pedroso de Moraes, M. Soares dos Santos Pozza, G. Tadeu dos Santos, N. Hioka, W. Caetano, Development and applications of safranin-loaded Pluronic® F127 and P123 photoactive nanocarriers for prevention of bovine mastitis: In vitro and in vivo studies, *Dyes and Pigments* 167 (2019) 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.04.037>.

B.M. Rodrigues, B.B. Saraiva, R.C. Da Silva Junior, K.S.S. Campanholi, C.R. Alcalde, P.C. Pozza, G.S. Madrona, M.S.S. Pozza, Safranin-O-Mediated Photodynamic Inactivation of Microorganisms Reduces Milk Contaminating Bacteria Count and Prevented New Cases of Mastitis, *Tropical Animal Science Journal* 46 (2023) 122–130. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.1.122>.

L.H. Moreira, J.C.P. de Souza, C.J. de Lima, M.A.C. Salgado, A.B. Fernandes, D.I.K. Andreani, A.B. Villaverde, R.A. Zângaro, Use of photodynamic therapy in the treatment of bovine subclinical mastitis, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 21 (2018) 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.009>.

E.M.S. Dorneles, M.D.A.M. Fonseca, J.A.P. Abreu, A.P. Lage, M.A.V.P. Brito, C.R. Pereira, H.M. Brandão, A.S. Guimarães, M.B. Heinemann, Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil, *Microbiologyopen* 8 (2019). <https://doi.org/10.1002/mbo3.736>.

A. Ashraf, M. Imran, Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis, *Anim Health Res Rev* 21 (2020) 36–49. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>.

A. Almeida, Photodynamic therapy in the inactivation of microorganisms, *Antibiotics* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040138>.

F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, W. Buchalla, E. Hellwig, A. Al-Ahmad, T. Maisch, Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't, *Crit Rev Microbiol* 44 (2018) 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.

CAPÍTULO 2 – BREAKING ANTIBIOTIC RESISTANCE: PORPHYRIN-DRIVEN PHOTOINACTIVATION AND PRIMING EFFECT ON MASTITIS-RELATED MDR BACTERIA

Manuscript submitted in accordance with the guidelines of the journal *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* on May 23, 2025.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a major infectious disease in dairy herds worldwide, with increasing prevalence of multidrug-resistant (MDR) pathogens affecting the efficacy of conventional antibiotic therapies. In this study, we explore antimicrobial photodynamic inactivation (PDI) as an innovative and sustainable strategy for controlling mastitis-associated bacteria. The photoinactivation potential was evaluated for four photosensitizers (PS) – palladium(II)/diphosphine-coordinated meso-tetrapyrrolyl porphyrins - Porf@DPPE, Porf@DPPP, Porf@DPPB, and Porf@DPPF - against six MDR bacterial strains isolated from bovine mastitis cases. Porf@DPPE, Porf@DPPP, and Porf@DPPB showed high triplet ($\Phi_T > 0.72$) and singlet oxygen ($\Phi_\Delta > 0.62$) quantum yields, while Porf@DPPF, despite lower values ($\Phi_T = 0.46$; $\Phi_\Delta = 0.42$), exhibited higher lipophilicity. All compounds induced significant photoinactivation, with Porf@DPPE achieving the lowest effective concentration (6.25 μM) and the broadest antimicrobial spectrum. Gram-negative isolates, such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, exhibited reduced susceptibility, requiring higher PS concentrations. DNA integrity assays indicated a potential PS mechanism of action on pathogens. Furthermore, combined treatment with Porf@DPPE or Porf@DPPF and sulfonamides restored antibiotic susceptibility in MDR *E. coli*, highlighting a synergistic interaction. These findings underscore the therapeutic potential of metalloporphyrin-based photosensitizers for mastitis control and support the integration of PDI with conventional antibiotics as a feasible approach to overcome multidrug-resistant bacteria in veterinary settings.

Keywords: Palladium(II)/diphosphine-coordinated meso-tetrapyrrolyl porphyrins; Photophysical properties; Mastitis-associated bacteria photoinactivation, Antibiotic-PS synergy.

INTRODUCTION

Bovine mastitis, characterized by inflammation of the mammary gland in cows, is a global sanitary challenge in dairy farming. Its multifactorial etiology includes physiological, traumatic, allergic, metabolic, and infectious origins, with a predominance of cases associated with microbial agents [1,2]. The disease is classified as clinical and subclinical forms, both responsible for structural and functional alterations in glandular tissue. In clinical manifestations, evident signs are observed, such as the presence of clots, pus, edema, hyperemia, and localized temperature increase. In the subclinical form, the absence of visible symptoms is offset by significant elevations in the somatic cell count (SCC) in milk, indicative of a latent inflammatory response [3–5].

Conventional treatment relies on antimicrobial use, a practice that, when prolonged or applied indiscriminately, contributes to pharmacological residues in milk and the development of bacterial resistance. These factors pose public health risks, as the consumption of contaminated products may trigger allergic reactions, toxicity, and the selection of resistant pathogens [6–8]. In this scenario, the search for effective and sustainable therapeutic alternatives is urgent to ensure food safety and reduce impacts on the production chain.

Photodynamic inactivation (PDI) presents a promising strategy to combat mastitis etiological agents. Although still incipient, this methodology has been proved effective in controlling some pathogenic agents related to mastitis both *in vitro* [9–12] and *in vivo* [13]. The technique is based on the combined application of a photosensitizer (PS), light at a specific wavelength, and molecular oxygen. The interaction of these elements generates reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen and free radicals, capable of inducing irreversible oxidative damage to microbial components, including membranes, proteins, and nucleic acids [9,14,15]. Among the advantages of PDI are its rapid action, low probability of inducing bacterial resistance – due to its multi-target mechanism – and versatility against Gram-positive and Gram-negative pathogens, fungi, and protozoa [15].

Commonly used PSs in photodynamic applications include porphyrins, chlorins, and phthalocyanines. These compounds are effective due to their robust light absorption and photophysical properties, such as high triplet state formation and singlet oxygen production. Strategies to enhance photodynamic response include modifying these compounds to improve their light absorption, targeting specificity, and solubility, as well as increasing the formation of reactive oxygen species. Furthermore, the conjugation with targeted delivery systems is underway to enhance the efficacy and selectivity of photodynamic therapy. These enhancements aim to maximize the therapeutic efficacy of photodynamic therapy by

intensifying the oxidative stress on targeted cells.

Recently, a series of meso-tetrapyrrolyl porphyrin derivatives were synthesized coordinated with palladium(II)/diphosphine complexes. While these compounds demonstrated anticancer activity in the absence of light [16] their photodynamic properties had not yet been investigated. Motivated by these results, the present work investigates the efficacy of PDI against multidrug-resistant bacterial strains isolated from cases of bovine mastitis, proposing an innovative and sustainable strategy for disease control and the combination with antibiotics to achieve a priming effect. Furthermore, the photophysical properties of the porphyrin complexes were evaluated, including the quantum yields of triplet state formation and singlet oxygen generation, in order to elucidate the mechanisms underlying their biological activity. These findings contribute to a comprehensive understanding of the potential of PDI in the treatment of antibiotic-resistant infections in veterinary applications.

METHODS

Photosensitizers

The samples under investigation were synthesized following the methods described in the literature[16]. These constitute a class of compounds where meso-tetrapyrrolylporphyrins (TPyP) have been coordinated with four peripheral palladium(II) complexes containing ligands which include 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane (dppe), 1,3-bis(diphenylphosphino)propane (dppp), 1,4-bis(diphenylphosphino)butane (dppb), and 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf). These complexes are referred to, for the sake of brevity, as Porf@DPPE, Porf@DPPP, Porf@DPPB, and Porf@DPPF, respectively. The chemical structures of these porphyrins are illustrated in Figure 1..

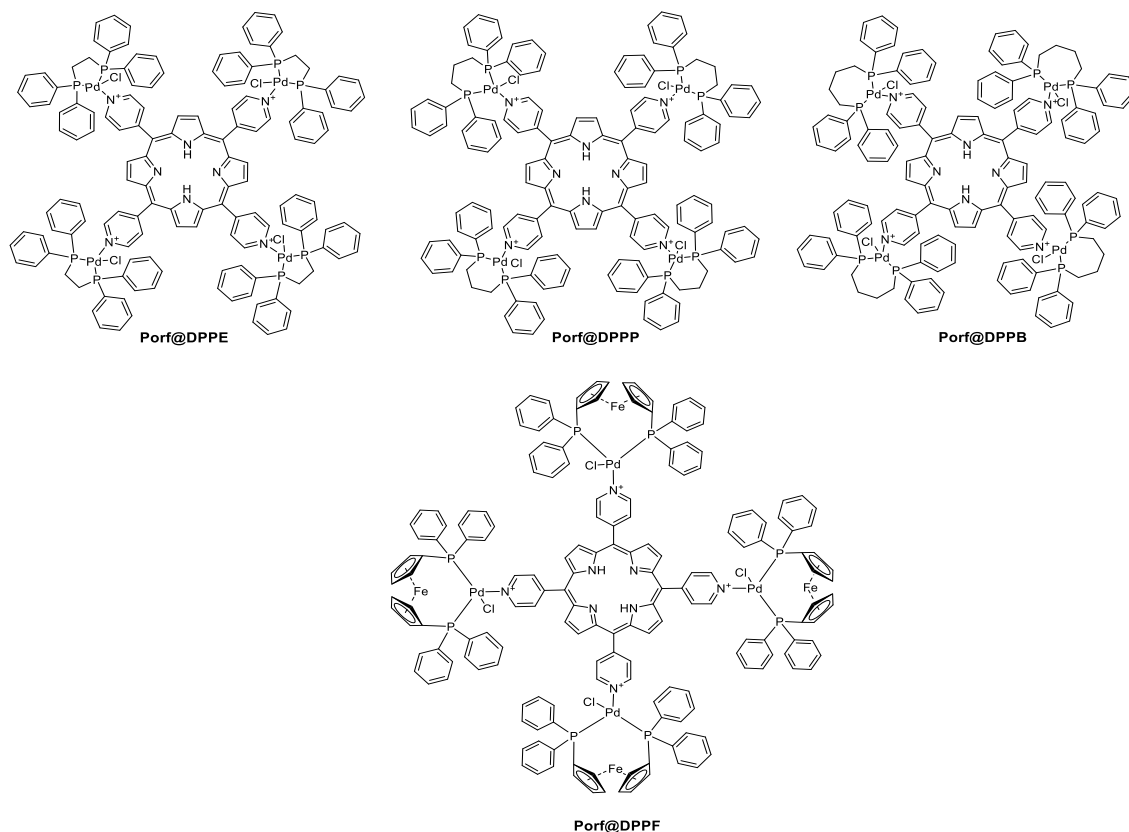


Figure 1. Molecular structures of palladium porphyrins.

The complexes were initially solubilized in Dimethyl Sulfoxide (DMSO), and their concentrations were adjusted according to the Lambert-Beer Law, utilizing the molar absorption coefficients as specified previously [16] All UV-vis measurements were performed using a spectrophotometer (Hitachi U-2900).

Photophysical characterization was subsequently conducted in DMSO solution. For biological assays, these DMSO solutions were further diluted with Phosphate-Buffered Saline (PBS) to attain the necessary concentrations, ensuring that the final DMSO concentration did not surpass 5%. All experiments were performed at ambient temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Triplet states measurements

Triplet excited states of complexes were studied using a home-built Laser Flash Photolysis (LFP) technique. The solutions were excited using the 532 nm second harmonic of a Nd:YAG laser, with a 10 Hz repetition frequency and a pulse duration of approximately 6 ns. Decay of the triplet state was monitored orthogonally via triplet-triplet absorption at 470 nm using a Sciencetech monochromator coupled to a Hamamatsu Photomultiplier tube (R928). More details can be found in the literature [17,18].

Measurements took place in a 1 cm² quartz cell, and the output power of laser was monitored with a Thorlabs power meter (PM100A) with a thermal sensor (S470C). Data were analyzed using OriginPro 8 software, with values averaged from three independent experiments.

The triplet state quantum yields (Φ_T) were determined using a previously described methodology [18]. This approach involves measuring the decay curves of the triplet state at various energy levels for both the sample under study and a standard compound with a known triplet state quantum yield (Φ_T^S). The meso-tetraphenylporphyrin (TPP) was used as the standard compound, which possesses $\Phi_T^S = 0.85$ in DMSO [19].

The Φ_T of the studied complexes were calculated in accordance with:

$$\Phi_T = \frac{\Delta A_0 A_{ex}^S C_0 \Delta A_{max}^S}{\Delta A_0^S A_{ex} C_0^S \Delta A_{max}} \Phi_T^S \quad (1)$$

In this equation, ΔA_0 represents the amplitude of the triplet state decay curves measured immediately following the termination of the excitation pulse. A_{ex} denotes the absorbance value at the excitation wavelength, C_0 indicates the molar concentration, and ΔA_{max} is the maximum value of ΔA_0 , obtained by approximating ΔA_0 with respect to the excitation pulse energy (E) at the signal saturation point ($E \rightarrow \infty$). The superscript 'S' refers to the values of the standard compound.

Singlet oxygen measurements

The singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ) was measured using a luminescence method in a customized system. An iZi – LASERLine continuous green laser module emitting at 532 nm was employed as the excitation source. The singlet oxygen phosphorescence emission was collected by an iHR 320 spectrometer from Horiba coupled to a cooled InGaAs detector (DSS-IGA 020L - Horiba). The Φ_Δ values were calculated in relation to TPP porphyrin in DMSO ($\Phi_\Delta^S = 0.52$) as a standard molecule [20] using the equation 2:

$$\Phi_\Delta = \left(\frac{I}{I_S}\right) \left(\frac{1-10^{-A_S}}{1-10^{-A}}\right) \left(\frac{n}{n_S}\right)^2 \Phi_\Delta^S \quad (2)$$

In this equation, I represent the integral of the intensity of the singlet oxygen emission spectrum for the sample under study, A the absorbances of the sample at the excitation wavelength at 532 nm and n refers to the refractive indexes of the solvent used. The index 'S' refers to the values corresponding to the standard compound. The absorbance values for the samples at this wavelength were adjusted to approximately 0.2 to ensure consistency. To ensure the solutions were saturated with oxygen, oxygen was bubbled through the solutions in the cuvette for 30 min.

Bacteria strains

The bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus warneri* were isolated from milk samples obtained from local rural producers (Goiás state, in the midwestern region of Brazil). These samples were provided by the Laboratory of Infectious Diseases and Bacteriology (LADIB) at the Department of Preventive Veterinary Medicine of Goiás University, Brazil. The strains were cultured and maintained on Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar; Kasvi®) under standard laboratory conditions.

Antimicrobial susceptibility testing

The antibiograms were performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [21] using disk diffusion assay with antimicrobial agents commonly employed in mastitis treatment. A total of 12 antimicrobials were evaluated: penicillin (10 U), ampicillin (10 µg), oxacillin (1µg), cephalothin (30 µg), ceftiofur (30 µg), amikacin (30 µg), erythromycin (15 µg), amoxicillin/clavulanic acid (30 µg), tetracycline (30 µg), doxycycline (30 µg), sulfonamides (300 µg), and gentamicin (10 µg). Bacterial suspensions were prepared by adjusting colonies in sterile saline (0.85%) to a turbidity equivalent to 0.5 McFarland (McF) standard. The standardized suspensions were inoculated onto Mueller-Hinton agar (Kasvi®) plates and incubated at 37°C for 24 h. After incubation, inhibition zones were measured, and isolates were classified as susceptible or resistant based on CLSI interpretive criteria.

Photodynamic Inactivation

Microbial growth inhibitory capacity of which PSs was individually determined using a broth microdilution assay in 96-well plates, following protocols adapted from the BrCAST [22].

Bacterial strains were cultured on Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi®) agar for 24 h, after which colonies were suspended in sterile saline (0.85%) and adjusted to a turbidity of 0.5 McF standard ($\sim 6 \times 10^8$ CFU/mL). From an initial concentration of 100 µM of each PS, a 2-fold serial dilution was made in a microtiter plate with BHI medium. A bacterial suspension (30 µL) of was incubated in each dilution of the PSs for 1 h at 37°C in the dark. BHI with bacteria without PS was used as a positive control and as a negative control was used only BHI with PS. A dark control (100 µM of PS) was used to evaluate the intrinsic antibacterial activity of PSs independent of light.

After plate preparation, the bacterial input concentration was measured spectrophotometrically (OD_{630nm}). Test plates were irradiated for 1 h using a Warm White LED system (BlackBox Smart LEDbox, BioLambda®) under an irradiance of 50,08 mW/cm² delivering a light dose of 180,29 J/cm². All plates were incubated at 37°C overnight. Post-incubation, OD_{630nm} values were reassessed, and the microbial growth inhibitory capacity was defined as the lowest PS concentration achieving $\geq 100\%$ growth inhibition relative to the bacterial input concentration. Experiments were conducted in duplicate, with results expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical comparisons between groups were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$) in GraphPad Prism® (version 6.0, La Jolla, CA, USA).

Evaluation of the synergy between PSs and conventional antimicrobials

The synergistic effects between PDI and sulfonamides were evaluated using a MDR *E. coli* treated with the two more efficiency PSs tested (Porf@DPPE and Porf@DPPF) in the Kirby-Bauer disk diffusion method[21]. The bacterial suspension (0.5 McF) was previously treated with PSs (100 μ M of Porf@DPPE and 50 μ M of Porf@DPPF), exposed to light irradiation under the same conditions of irradiance presented in the PDI assay. Bacterial suspension aliquots were taken every 15 min until 60 min and spread in Mueller-Hinton agar plates. Immediately after PDI treatment, antibiotic disks containing sulfonamide were placed on the agar surface. Plates were incubated at 37°C for 24 h under aerobic conditions. Following incubation, the diameters of inhibition zones were measured and compared to untreated controls to assess the restoration of antibiotic susceptibility. Synergy was defined as a ≥ 2 mm difference in inhibition zones between untreated and treated samples, indicating enhanced antimicrobial activity [23–25].

Bacterial DNA Integrity Analysis

Both Porf@DPPE and Porf@DPPF were also used for the integrity DNA tests using DNA pCAMBIA3301 binary plasmid vector as a model. The DNA integrity was assessed using agarose gel electrophoresis 0.5%. Initially, samples were prepared with different compositions. For the treatment groups, 3 μ L of DNA (50 ng), 3 μ L of saline solution, and 19 μ L of photosensitizer (25 μ M) were added to each well. For DNA control, the same DNA concentration in saline solution was used. Additionally, a dark control was conducted under the same conditions as the treatment but without light irradiation.

Samples were irradiated in two phases, with aliquots collected every 15 min. After irradiation. Samples, previously mixed with loading dye, were loaded into the gel and subjected to electrophoresis at 100 V for approximately 40 min. Finally, the gel was visualized under UV light, and DNA integrity was compared to a non-irradiated control DNA.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Photophysical characterization

Figure 2 presents the absorption spectra of the studied porphyrins and the emission spectra of the light source used (BlackBox Smart LEDbox, BioLambda®). All porphyrin complexes exhibit a similar spectrum characterized by absorption in the visible region of the electromagnetic spectrum. These complexes show an intense Soret band around 420 nm and Q-bands ranging from 490 to 670 nm. Figure 2 also illustrates the overlap between the emission spectrum of the light source and the main bands of the porphyrin's complexes.

The triplet state plays a fundamental role in photodynamic applications. It is formed after the photosensitive agent (PS) absorbs light; in this case, the molecule undergoes an electronic transition from the ground state to the excited singlet state, and subsequently relaxes through a non-radiative process (intersystem crossing) to the longer-lived triplet state. This state is critical as it allows the transfer of energy or electrons to molecular oxygen, producing ROS such as singlet oxygen. These reactive species are highly effective in inducing cellular damage, ultimately leading to cell death [26].

The formation of triplet states can be effectively assessed through the quantum yield of triplet state formation (Φ_T). This quantum yield serves as a quantitative measure that indicates how efficiently a molecule converts absorbed light into the triplet state. The Φ_T of the studied complexes were determined in accordance with Equation (1). This calculation involved analyzing the T_1 state decay kinetic curves (ΔA) for porphyrins complexes under study and the standard compound (TPP).

Initially, measurements of the triplet state decay were performed at different levels of excitation pulse energy, as illustrated in Figure 2b. Subsequently, a graph of the maximum amplitude of the triplet state decay, measured immediately after the termination of the excitation pulse (ΔA_0), as a function of the laser pulse energy, is obtained as shown in Figure 2c. From Figure 2c, in the low energy region, we can obtain the term $\Delta A_0 / \Delta A_0^s$ from Equation (1), which represents the ratio between the amplitude of the triplet state of the studied compound (ΔA_0)

and the amplitude of the triplet state of the standard compound (ΔA_0^S), at same pulse energy. In the high energy region, the maximum ΔA_0 value (ΔA_{max}) can be determined by extrapolating the dependence of ΔA_0 on the excitation pulse energy (J) as J approaches infinity. This extrapolation was performed using exponential fitting, as illustrated in Figure 2c. Finally, the obtained values of Φ_T are listed in Table 1.

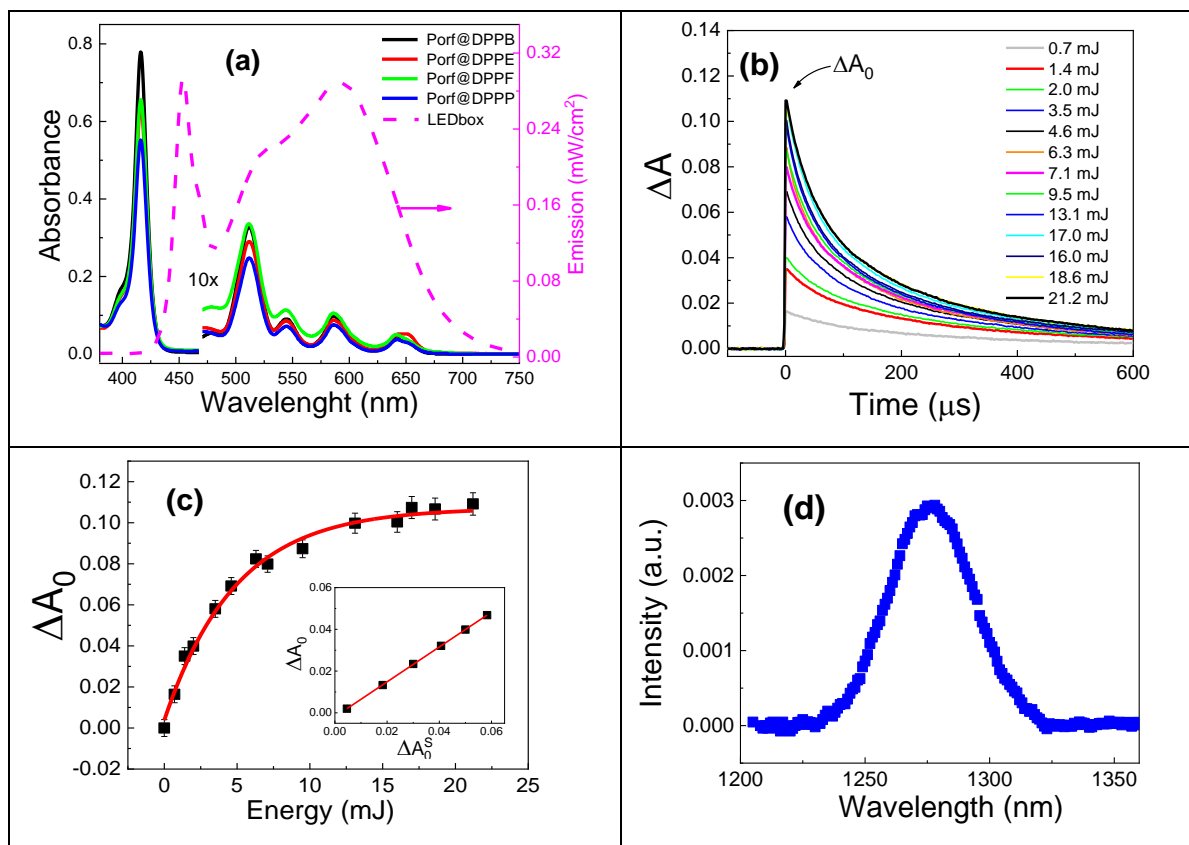


Figure 2 – Photophysical data. (a) UV-Vis absorption spectrum of studied complex (10 mM) and LEDBox emission spectrum; (b) T1 state decay kinetic curves (ΔA) for the Porf@DPPE complex under study in different excitation pulse energy; (c) ΔA_0 as a function of laser pulse energy and (d) singlet oxygen emission spectrum.

Similarly, the production of singlet oxygen is evaluated through the singlet oxygen quantum yields (Φ_Δ). This quantum yield provides a quantitative assessment of how effectively a photosensitizer converts the energy from the triplet state to singlet oxygen. A higher quantum yield indicates that a substantial portion of the energy transitions into singlet oxygen, which is critical for applications like photodynamic therapy where singlet oxygen is the primary cytotoxic agent responsible for targeting and destroying diseased cells. Figure 1d illustrate the singlet oxygen emission spectra produced by Porf@DPPE complex where a band centered 1275 nm was also attempted. The Φ_Δ were obtained in accordance with Equation 2 and are presented in Table 1.

Table 1 – Values of triplet state quantum yields (Φ_T), singlet oxygen quantum yields (Φ_Δ), and partition coefficient (P)*

Sample	τ_{T_1} (μ s)	Φ_T	Φ_Δ	Log P*
Porf@DPPE	172±19	0.79±0.02	0.62±0.02	2.15
Porf@DPPP	204±15	0.69±0.02	0.64±0.02	2.20
Porf@DPPB	169±17	0.80±0.02	0.67±0.05	2.56
Porf@DPPF	65±3	0.45±0.02	0.42±0.04	3.10

*Dalton Trans., 2021, 50, 16254–16264.

The Φ_T of the free-base porphyrin TPyP (5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin) is known to vary depending on the solvent and experimental conditions, with typical values ranging from 0.73 to 0.90 [27,28]. Notably, coordination with palladium(II)/diphosphine complexes does not significantly alter the Φ_T values for the complexes Porf@DPPE, Porf@DPPP, and Porf@DPPB (Table 1). These high triplet quantum yield values are strong indicators of the photodynamic application potential of the studied compounds.

The data on triplet state formation are further supported by the independently measured singlet oxygen generation (Φ_Δ), one of the main ROS essential for photodynamic action (Table 1). The consistency between these two sets of photophysical parameters reinforces the photodynamic potential of the investigated compounds, highlighting their capacity to efficiently populate the triplet state and subsequently generate cytotoxic species upon light activation.

Although the complexes Porf@DPPE, Porf@DPPP, and Porf@DPPB present high values of Φ_T and Φ_Δ , the Porf@DPPF complex, which contains a ferrocene moiety, presents lower triplet lifetime and triplet state quantum yield, suggesting that the presence of ferrocene may quench the excited triplet state or alter the intersystem crossing efficiency. The presence of ferrocene moieties in porphyrin-based systems has been consistently shown to significantly reduce both the quantum yield and the lifetime of the triplet excited state. This quenching effect is attributed to non-radiative deactivation pathways, primarily via electronic energy transfer or electron transfer mechanisms, likely facilitated by the geometric distortion of the triplet state induced by interaction with ferrocene [29]. Additionally, structural factors such as the number of attached ferrocene units and their spatial proximity to the chromophore have been shown to modulate the extent of quenching, with more pronounced suppression observed in systems bearing multiple ferrocene substituents [30,31].

Antibiogram

The conventional antibiotic therapy is the principal treatment strategy, and the selection of antimicrobials must consider the presence of bacterial resistance, based on the

understanding that ineffective antimicrobial agents have little impact on the infectious process and the control of new infection episodes [32–35].

The antimicrobial susceptibility tests demonstrated that all isolates exhibited resistance to more than one pharmacological class (Table 2). Among the contagious pathogens, *S. aureus* and *S. agalactiae* were the most prevalent in dairy herds. *S. agalactiae* showed resistance to 50% (6/12) of antibiotics tested. This isolate is associated with contagious infections, especially subclinical manifestations that vary in severity, being responsible for the increase in Somatic Cell Count (SCC) and reduction in milk production [5,36]. *S. aureus* however, despite its lower resistance (25%), its prevalence may predispose to a chronic progression of the disease [37].

Typically, the resistance is not limited to beta-lactams only; multi-resistant isolates also exhibit high resistance to aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, fluoroquinolones, and other antimicrobial agents, which complicates the eradication of infections and poses challenges for clinical management [38,39].

Bacteria such as *E. coli* and *P. aeruginosa*, associated with coliforms, exhibited the highest resistance to the tested antimicrobials. Environmental pathogens, particularly those related to coliforms, are recognized as the primary causes of clinical mastitis and are associated with high severity and short duration [8,40]. Clinical mastitis results in significant morbidity and mortality among dairy cows,[41] in addition to damaging the milk-secreting cells and reducing the lifespan of affected animals [42].

Table 2. Susceptibility profile of bacterial pathogens to antimicrobial agents. S-Susceptible; R-Resistant; *-Intrinsic Resistance.

Antimicrobial	<i>S. aureus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	Pharmacological Class
Ampicillin	R	R	S	R*	S	R	Beta-lactam (Aminopenicillin)
Amikacin	S	R	R	S	R	S	Aminoglycoside
Amoxicillin/Clavulanic acid	S	S	S	R*	S	R	Beta-lactam + Beta-lactamase inhibitor e
Cephalothin	S	S	S	R	R	R	Beta-lactam (1st-gen.cephalosporin)
Ceftiofur	S	S	S	R	R	R	Beta-lactam (3rd-gen.cephalosporin)
Doxycycline	S	S	R	R	R	R	Tetracycline
Penicillin	R	R	S	R	S	R	Beta-lactam (Natural penicillin)
Oxacillin	S	R	R	R	R	R	Beta-lactam (Penicillinase-resistant penicillin)
Erythromycin	S	S	R	R	R*	R	Macrolide
Gentamicin	S	S	R	S	R	R	Aminoglycoside
Sulfonamides	R	R	S	R	R*	R	Sulfonamide (Folate synthesis inhibitor)
Tetracycline	S	S	R	R*	R	R	Tetracycline

Bacterial photoinactivation

Photodynamic Inactivation (PDI) has emerged as a strategy for controlling pathogens associated with bovine mastitis, especially in the context of the global antimicrobial resistance crisis. In this work, the use of meso-tetrapyridyl porphyrin linked to palladium(II)/diphosphine complexes against mastitis-associated pathogens represents an innovative contribution, expanding the therapeutic arsenal for this globally relevant disease.

Among the evaluated PSs, the Porf@DPPE and Porf@DPPF demonstrated superior microbial growth inhibitory in cultures of Gram-positive bacteria as *S. aureus* and *S. agalactiae*, two of the main mastitis bacteria isolated (Figure 3 and 4). In contrast, Gram-negative bacteria, such as *E. coli* and *P. aeruginosa*, exhibited a selective response to the specific Porf@DPPE.

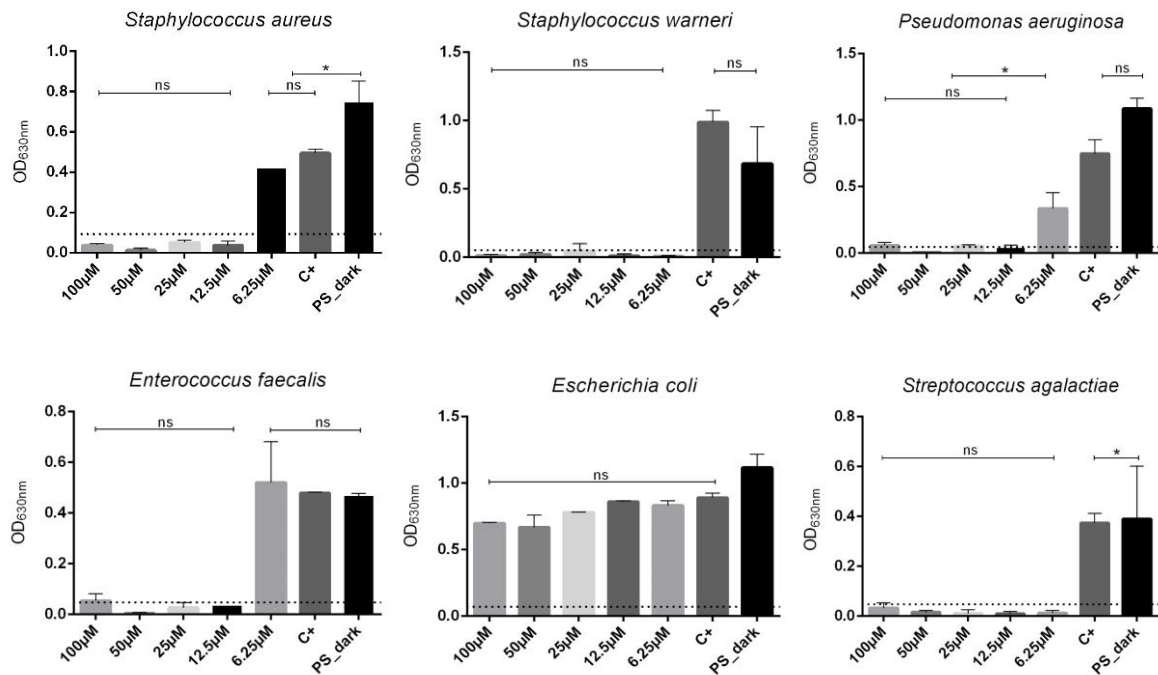


Figure 3. Bacterial photoinactivation (0.5 McFarland suspension) induced by Porf@DPPE after 1 h of irradiation with a white LED system (irradiance: 50.08 mW/cm²; total light dose: 180.29 J/cm²). (*) statistical significance ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (ns) no significant difference. (C+) positive control. PS_dark – dark control.

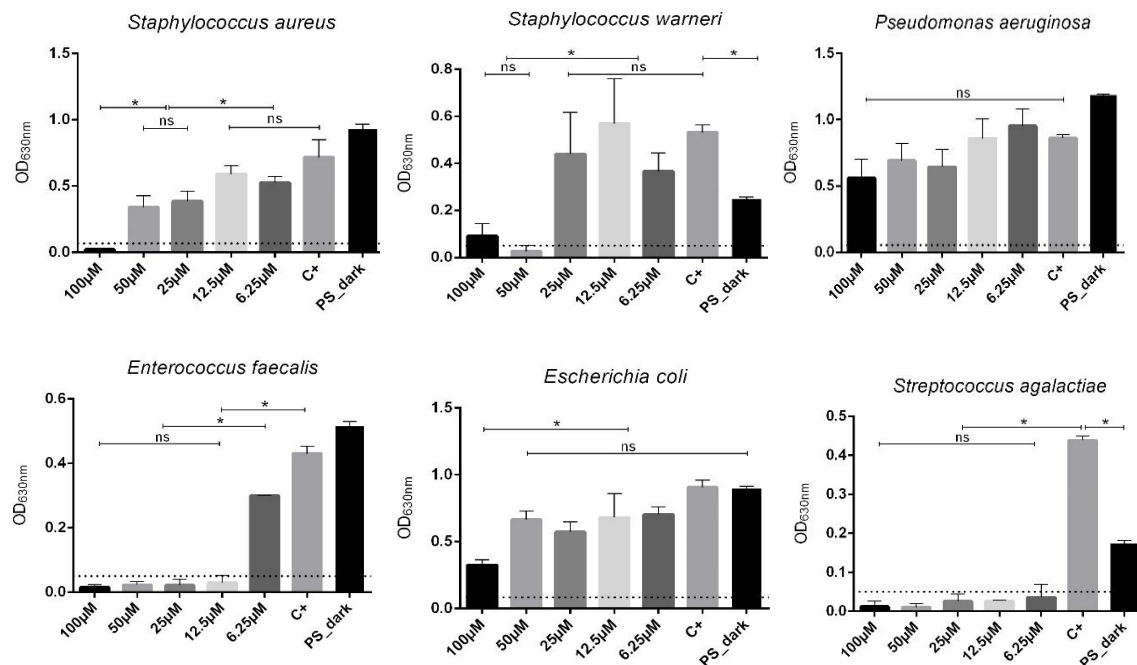


Figure 4. Bacterial photoinactivation (0.5 McFarland suspension) induced by Porf@DPPF after 1 h of irradiation with a white LED system (irradiance: 50.08 mW/cm²; total light dose: 180.29 J/cm²). (*) statistical significance ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (ns) no significant difference. (C+) positive control. PS_dark – dark control.

S. aureus is notable for its ability to form biofilms, a virulence factor that facilitates adhesion and colonization of the mammary gland epithelium. Additionally, *S. aureus* can exhibit methicillin resistance (MRSA) and cause greater reductions in milk production compared to other pathogens [43,44]. However, the absence of an outer membrane facilitates the action of cationic photosensitizers, as those used in this work, which could easily interact with biomolecules like teichoic acids displayed in the cell wall and increasing photodamage.

Also, with regard to the Porf@DPPE, greater potency against Gram-positive bacteria was observed at lower PS concentrations (6.25 μM) for *S. agalactiae*, confirmed by growth below the bacterial input concentration (dotted line). Conversely, its inefficacy against *E. coli* reinforces the need for complementary strategies, such as conjugation with chelating agents (e.g., EDTA), to overcome the LPS barrier [45]. Porf@DPPF demonstrated moderate activity against *E. coli* only at high concentrations (100 μM), indicating that saturation of the outer membrane is critical for its integration into membranes and effectiveness. In Gram-positive bacteria, its efficacy at lower concentrations (12.5 - 6.25 μM) could also be associated to its hydrophobicity. Compared to the other photosensitizers, Porf@DPPF exhibits a better hydrophobic characteristic [16] (Table 1). and, therefore, an ability to integrate into biomembranes, which makes it a good option also for testing against biofilms.

Although the photoinactivation using of Porf@DPPE and Porf@DPPF was effective at low concentrations and on a wide range of isolates, Porf@DPPP was the most efficient in controlling the most resistant strains such as *E. coli* and *P. aeruginosa* at high concentrations (Figure 5). In this case, a PS multivalent formulation could be an interesting strategy for eliminating bacteria in a single treatment.

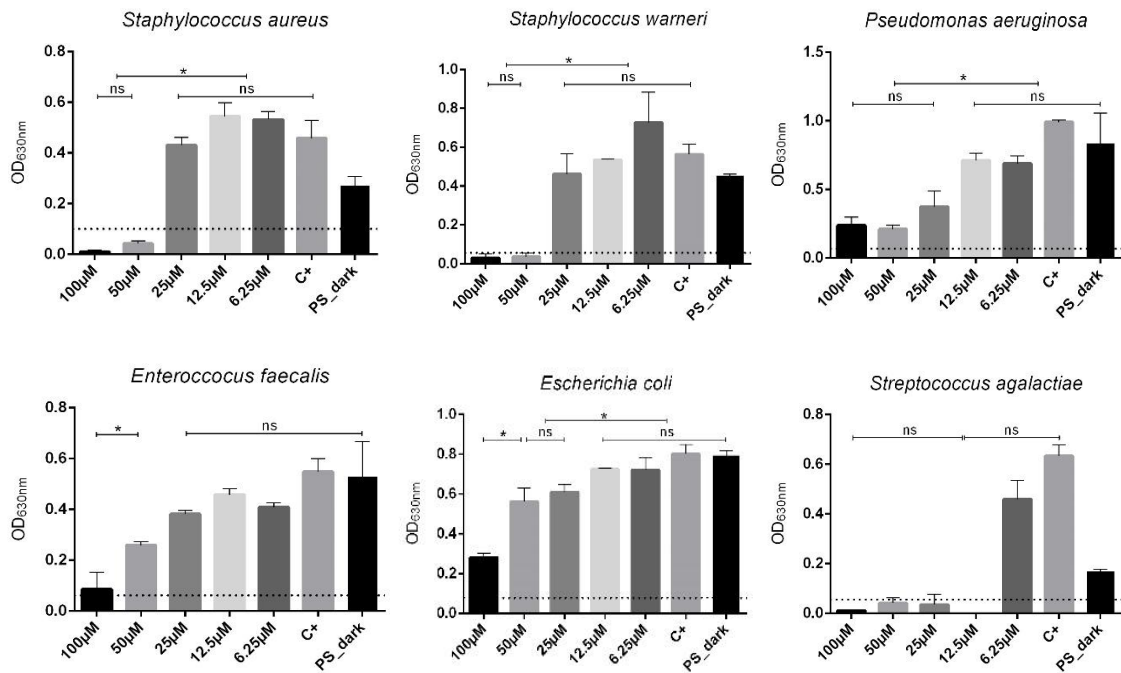


Figure 5. Bacterial photoinactivation (0.5 McFarland suspension) induced by Porf@DPPP after 1 h of irradiation with a white LED system (irradiance: 50.08 mW/cm²; total light dose: 180.29 J/cm²). (*) statistical significance ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (ns) no significant difference. (C+) positive control. PS_dark – dark control.

The use of the porphyrin Porf@DPPB in *E. coli* and *P. aeruginosa* did not result in significant reductions in bacterial growth. Conversely, under the same experimental conditions, Gram-positive bacteria such as *S. aureus*, *S. warneri*, *E. faecalis*, and *S. agalactiae* showed significant reductions in bacterial growth (Figure 6).

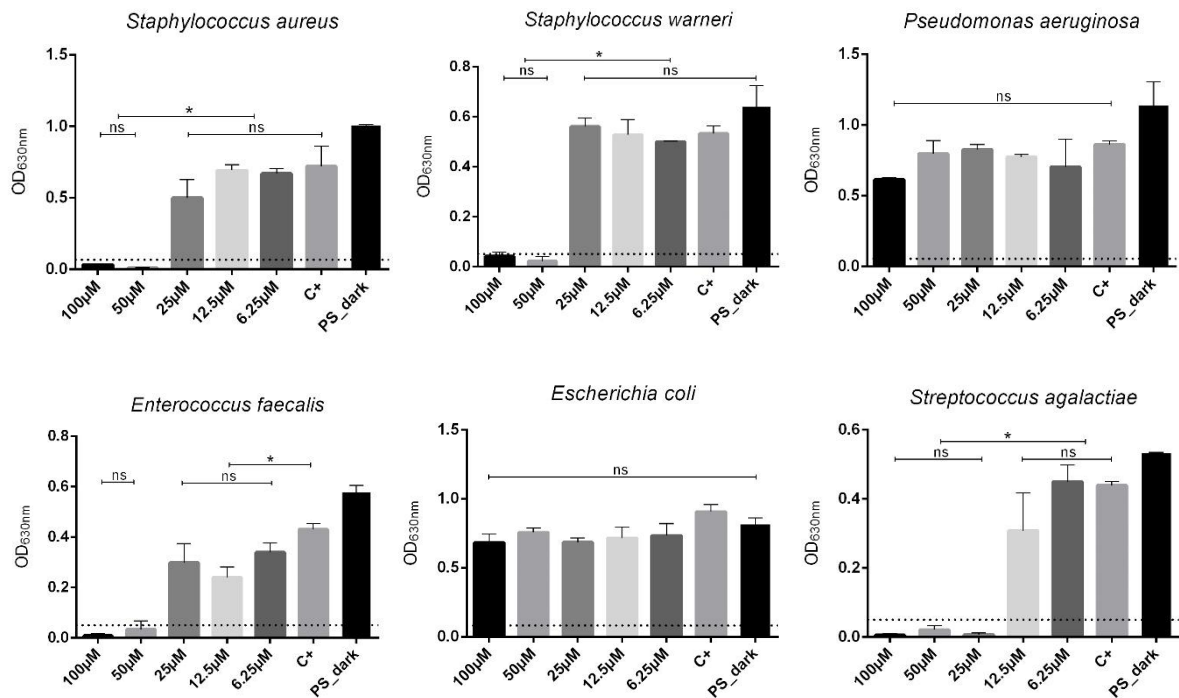


Figure 6. Bacterial photoinactivation (0.5 McFarland suspension) induced by Porf@DPPB after 1 h of irradiation with a white LED system (irradiance: 50.08 mW/cm²; total light dose: 180.29 J/cm²). (*) statistical significance ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (ns) no significant difference. (C+) positive control. PS_dark – dark control.

Considering studies currently described in the literature, the use of PS molecules to control bacteria related to mastitis is still incipient and restricted to the use of dyes such as methylene blue [9,12], toluidine blue [13] and safranin [11], which are considered first generation PSs. Therefore, the results in this study provide important information about new PS molecule candidates for controlling the main mastitis-related pathogens. The characterization of photophysical parameters of PSs adds even more information about the viability of molecules for use in PDI. Moreover, not considering the specific methodologies for each type of SP (irradiation conditions, time and dose), compared to the MEC observed in this study (6.25 µM), the results described in the literature extrapolate significantly in order of magnitude to those obtained in our work [9,11,12]. In both photoinactivation tests, a dark control was used to evaluate the intrinsic bactericidal activity of each PS on the different bacterial species. The concentration used (100 µM) was deliberately overestimated and, for most bacteria, no cytotoxic effect in the absence of light was attributed to the PS in culture. Therefore, at the minimum effective concentrations (MEC) determined, the adoption of photodynamic

inactivation as a mastitis control method can be safe and effective.

In both photoinactivation tests, a dark control was used to evaluate the intrinsic bactericidal activity of each PS on the different bacterial species. The concentration used (100 μM) was deliberately overestimated and, for most bacteria, no cytotoxic effect in the absence of light was attributed to the PS in culture. At the minimum effective concentrations determined, the adoption of photodynamic inactivation as a mastitis control method can be safe and effective. However, the molecules still need to be tested for their toxicity/genotoxicity in animal cells, permeability or distribution in tissues, stability, etc., fundamental procedures for their application in pre-clinical phase tests *in vivo*. Furthermore, just as important as the potential use of PSs *in vivo* is their application for disinfecting milking lines. As our laboratory has received several samples of isolates of the same bacteria from mechanical milking devices, the use of PSs could easily be adapted to disinfect the milking line before or after use, with the aim of inactivating the circulating bacteria, thus helping to reduce or eliminate mastitis in the herd.

In the **DNA integrity assay**, the results obtained from agarose gel electrophoresis revealed significant differences between the controls and samples treated with the photosensitizers Porf@DPPF and Porf@DPPE (Figure 7).

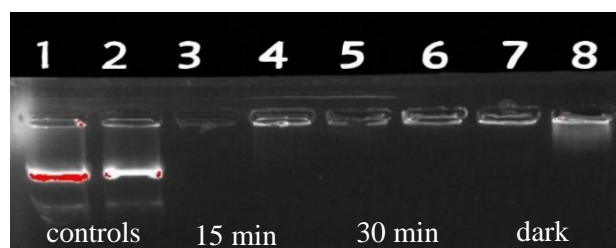


Figure 7. DNA integrity in samples treated with DPPF and DPPE. Lanes 1 and 2: DNA controls without PS irradiated for 15 min and 30 min, respectively. Lanes 3 and 4: DNA treated with Porf@DPPF and irradiated for 15 and 30 min, respectively. Lanes 5 and 6: DNA treated with Porf@DPPE and irradiated for 15 and 30 min, respectively. Lanes 7 and 8: dark controls without irradiation treated with Porf@DPPF and Porf@DPPE, respectively. The irradiation was performed using a white LED system with an irradiance of 50.08 mW/cm^2 .

A distinct and high-molecular-weight DNA band was observed (lanes 1 and 2), indicating the preservation of DNA integrity in the absence of PSs. In contrast, the DNA samples treated with PS (lanes 3 to 8) a reduction in the intensity of the main DNA band was exhibited, indicative of DNA fragmentation. Analysis of different exposure times of 15 and 30 min (lanes 3-4 and 5-6 respectively) has not revealed a time-dependent effect, with the same DNA degradation rate. In the absence of irradiation (dark), both PSs showed DNA fragmentation.

Previous studies have identified the capacity of all PSs used in this work to interact

with DNA [16]. However, despite our analyses corroborated these results, the results suggest that the internalization of these PSs, during PDI, occurs mainly at the level of the cytoplasmic membrane, a hypothesis supported by the maintenance of bacterial viability in isolates in the dark conditions, where no significant reduction in bacterial growth was observed.

Antibiotic-PSs synergy

The limited efficacy of PDT and antibiotics against *Escherichia coli* highlights the intrinsic resistance related to the virulence of this isolate. In this context, an additional control approach may be used by the combination of photodynamic inactivation and conventional antibiotic treatment.

The integration of PDI with conventional antimicrobial agents has emerged as a promising strategy to optimize therapeutic efficacy against resistant pathogens. Reducing light exposure duration or minimizing PS concentration has been shown to mitigate adverse effects while enhancing clinical viability. Furthermore, synergistic interactions between PDI and antimicrobial agents may restore their efficacy, providing a dual therapeutic advantage by disrupting bacterial resistance mechanisms and potentiating traditional treatments [23].

The two efficiency PSs (Porf@DPPE and Porf@DPPF) were tested to antibiotic-PS synergy using *E. coli* MDR strain. As illustrated, Porf@DPPE treatment did not induce inhibition zones around the antibiotic disk after 15 min of irradiation, indicating persistent sulfonamide resistance (Figure 8 A). In contrast, a distinct and evident inhibition zone was observed following 30 min of irradiation (Figure 8 B), showing that prior treatment with PS restored the sensitivity of the previously resistant bacteria to the antibiotic. For Porf@DPPF (Figures 8 C–F), a progressive increase in the inhibition zone diameter was observed depending on irradiation time, with a more pronounced effect under prolonged light exposure. This dose-dependent and time-dependent irradiation effect behavior indicate the synergistic efficacy between PDI and the antibiotic against the MDR *E. coli*.

Following synergy, the isolate was reclassified as sensitive according to the criteria of the CLSI antimicrobial susceptibility scale. Combined therapy may overcome resistance mechanisms, possibly by increasing bacterial membrane permeability after PDI, promoting the disruption of cellular components, including the inactivation of enzymes and proteins associated with resistance mechanisms, as well as the degradation of LPS, which potentiates bacterial susceptibility to antibiotics [23].

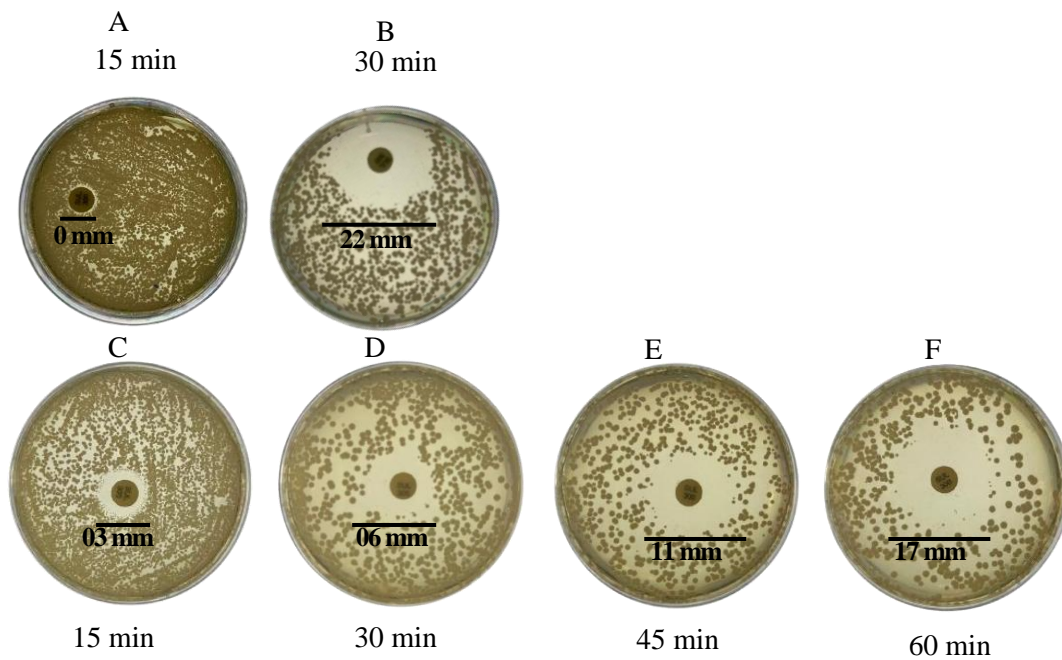


Figure 8. Dose and irradiation time-dependent effect of PSs on reversing *E. coli* MDR to sulfonamide. Panel A and B (100 μM of Porf@DPPE). Panel C - F (50 μM of Porf@DPPF).

CONCLUSION

Despite the technological advances in antimicrobial Photodynamic Inactivation, its clinical application faces significant challenges, especially in complex biological contexts. Studies have shown that biological matrices, such as milk casein, interfere with the efficacy of PDI by dispersing light and reducing the penetration of the PS, thereby compromising the accuracy of therapeutic dosimetry [47,48]. Therefore, the standardization of irradiation protocols and in vivo validation in animal models are critical steps to translate these findings into veterinary practice, offering a promising alternative for the control of bovine mastitis.

The findings of this study demonstrate that the efficacy of antimicrobial PDI varies significantly depending on the photosensitizer and bacterial isolate evaluated. The compounds Porf@DPPB, Porf@DPPE, and Porf@DPPF exhibited promising activity against Gram-positive bacteria, with a concentration-dependent response. In contrast, Porf@DPPP displayed broad-spectrum action, including activity against Gram-negative strains, although requiring higher concentrations to inhibit bacterial growth.

DNA degradation analysis revealed that PDI induces genetic material cleavage, suggesting a mechanism of action associated with nucleic acid damage. However, in bacterial contexts, the insignificant antimicrobial effect of the non-irradiated (dark) controls, suggest a mechanism of action of PSs directed exclusively on cellular membrane integrity and cell wall

structure

The priming effect between PDT and sulfonamides reversed bacterial resistance in MDR *E. coli*, restoring its susceptibility to the antibiotic. This result demonstrates the indirect potential of PDT as an adjuvant strategy to conventional bovine mastitis control.

REFERENCES

- [1] I.R. Dohoo, J. Smith, S. Andersen, D.F. Kelton, S. Godden, Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample, *J Dairy Sci* 94 (2011) 250–261. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3559>.
- [2] V. Pereira Massote, B.M. Zanateli, G.V. Alves, E.S. Gonçalves, E. Guedes, DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE MASTITE BOVINA: uma revisão de literatura, n.d.
- [3] H. Hogeveen, K. Huijps, T.J.G.M. Lam, Economic aspects of mastitis: New developments, *N Z Vet J* 59 (2011) 16–23. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>.
- [4] T.C.F. Carvalho-Sombra, D.D. Fernandes, B.M.O. Bezerra, D.C.S. Nunes-Pinheiro, Systemic inflammatory biomarkers and somatic cell count in dairy cows with subclinical mastitis, *Vet Anim Sci* 11 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100165>.
- [5] W.N. Cheng, S.G. Han, Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review, *Asian-Australas J Anim Sci* 33 (2020) 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>.
- [6] H. Langoni, A. Salina, G.C. Oliveira, N.B. Junqueira, B.D. Menozzi, S.F. Joaquim, Considerações sobre o tratamento das mastites¹, *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 37 (2017) 1261–1269. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>.
- [7] S. Barberato-Filho, C. de Cássia Bergamaschi, F. de Sá Del Fiol, F.B. Antoniazzi, J.M. Stievano, A.C. Justo, C. de Paula Souza, M.T. Silva, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Americas: Systematic review and metanalysis of prevalence in food-producing animals, *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health* 44 (2020). <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.48>.
- [8] K. Sharun, K. Dhama, R. Tiwari, M.B. Gugjoo, M. Iqbal Yatoo, S.K. Patel, M. Pathak, K. Karthik, S.K. Khurana, R. Singh, B. Puvvala, Amarpal, R. Singh, K.P. Singh, W. Chaicumpa, Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review, *Veterinary Quarterly* 41 (2021) 107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>.
- [9] F.P. Sellera, C.P. Sabino, M.S. Ribeiro, R.G. Gargano, N.R. Benites, P.A. Melville, F.C. Pogliani, In vitro photoinactivation of bovine mastitis related pathogens, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 13 (2016) 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.08.007>.
- [10] C.H. Rodrigues, E.A.G. Araújo, R.P. Almeida, T.P. Nascimento, M.M. Silva, G. Abbas, F.D. Nunes, E. Lins, M.C.B. Lira-Nogueira, J.S.A. Falcão, A. Fontes, A.L.F. Porto, G. Pereira, B.S. Santos, Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102315>.
- [11] B.M. Rodrigues, B.B. Saraiva, R.C. Da Silva Junior, K.S.S. Campanholi, C.R. Alcalde, = P.C. Pozza, G.S. Madrona, M.S.S. Pozza, Safranin-O-Mediated Photodynamic Inactivation of Microorganisms Reduces Milk Contaminating Bacteria Count and Prevented New Cases of Mastitis, *Tropical Animal Science Journal* 46 (2023) 122–130. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.1.122>.
- [12] C.H. Rodrigues, E.A.G. Araújo, R.P. Almeida, T.P. Nascimento, M.M. Silva, G. Abbas, F.D. Nunes, E. Lins, M.C.B. Lira-Nogueira, J.S.A. Falcão, A. Fontes, A.L.F. Porto, G. Pereira, B.S. Santos, Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis,

- Photodiagnosis Photodyn Ther 34 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102315>.
- [13] L.H. Moreira, J.C.P. de Souza, C.J. de Lima, M.A.C. Salgado, A.B. Fernandes, D.I.K. Andreani, A.B. Villaverde, R.A. Zângaro, Use of photodynamic therapy in the treatment of bovine subclinical mastitis, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 21 (2018) 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.009>.
- [14] C.H. Rodrigues, E.A.G. Araújo, R.P. Almeida, T.P. Nascimento, M.M. Silva, G. Abbas, F.D. Nunes, E. Lins, M.C.B. Lira-Nogueira, J.S.A. Falcão, A. Fontes, A.L.F. Porto, G. Pereira, B.S. Santos, Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102315>.
- [15] G.K. Couto, F.K. Seixas, B.A. Iglesias, T. Collares, Perspectives of photodynamic therapy in biotechnology, *J Photochem Photobiol B* 213 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112051>.
- [16] K.M. Alves, J. Honorato, L.M. Lião, V.S. Velozo-Sa, A.P.M. Guedes, J.D.L. Dutra, A.P. Ayalla, J. Ellena, A.A. Batista, P.J. Gonçalves, Meso-Tetra-(4-pyridyl)porphyrin/palladium(ii) complexes as anticancer agents, *Dalton Transactions* 50 (2021) 16254–16264. <https://doi.org/10.1039/d1dt01850g>.
- [17] I.E. Borissevitch, P.J. Gonçalves, L.P. Ferreira, A.A. Kostyukov, V.A. Kuzmin, Characterization of Triplet State of Cyanine Dyes with Two Chromophores Effect of Molecule Structure, *Technologies (Basel)* 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/technologies11040090>.
- [18] I.E. Borissevitch, E. Silveira-Alves, C.G.L. Almeida, G.R.L. Souza, S.S. Sokolov, P.J. Gonçalves, An Alternative Method to Determine the Quantum Yield of the Excited Triplet State Using Laser Flash Photolysis, *Photonics* 10 (2023). <https://doi.org/10.3390/photonics10040409>.
- [19] T.H. Tran-Thi, J.F. Lipskier, P. Maillard, M. Momenteau, J.-M. Lopez-Castillo, J.-P. Jay-Germ, Effect of the Exciton Coupling on the Optical and Photophysical Properties of Face-to Face Porphyrin Dimer and Trimer. A Treatment Including the Solvent Stabilization Effect Introduction Dimers and oligomers of porphyrins and phthalocyanines have, 1992. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [20] M. Korínek, R. Dědic, A. Molnár, A. Svoboda, J. Hála, A comparison of photosensitizing properties of meso-tetraphenylporphyrin in acetone and in dimethyl sulfoxide, in: *J Mol Struct*, 2005: pp. 727–731. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.036>.
- [21] M.P.. Weinstein, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [22] Á. Mueller-Hinton, A. Meios para o teste de disco-difusão*, n.d. <http://www.brcast.org>.
- [23] A. Woźniak, N. Burzyńska, I. Zybala, J. Empel, M. Grinholc, Priming effect with photoinactivation against extensively drug-resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*, *J Photochem Photobiol B* 235 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112554>.
- [24] A. Wozniak, A. Rapacka-Zdonczyk, N.T. Mutters, M. Grinholc, Antimicrobials are a photodynamic inactivation adjuvant for the eradication of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Front Microbiol* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00229>.
- [25] A. Sulek, B. Pucelik, M. Kobielski, A. Barzowska, J.M. Dąbrowski, Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: Effect of charge, lipophilicity, ROS generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro, *Int J Mol Sci* 21 (2020) 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21228716>.
- [26] A.B. de Freitas, H.H.A. Rezende, G.R.L. de Souza, P.J. Gonçalves, Photodynamic inactivation of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* difficult-to-treat resistance (DTR)

- by a cationic porphyrin, *J Photochem Photobiol B* 265 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2025.113133>.
- [27] K. Kalyanasundaram, Photochemistry of Water-Soluble Porphyrins: Comparative Study of Isomeric Tetrapyrrolyl- and Tetraakis (N-Methylpyridiniumyl) porphyrins, (n.d.). <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [28] D.-J. Qian, A. Planner, J. Miyake, D.F. Frackowiak, Photothermal effects and fluorescence spectra of tetrapyrrolylporphyrins, 2001.
- [29] A. Farmilo, F. Wilkinson, TRU'LLX STATE QUENCHTNG BY FERROCENE, n.d.
- [30] J.I. Mapley, P. Hayes, D.L. Officer, P. Wagner, K.C. Gordon, Investigation of Ferrocene Linkers in β -Substituted Porphyrins, *Journal of Physical Chemistry A* 124 (2020) 5513–5522. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c00786>.
- [31] H. Mansour, M.E. El-Khouly, S.Y. Shaban, O. Ito, N. Jux, Synthesis and photophysical studies of porphyrin-ferrocene conjugates, 2007. www.worldscientific.com.
- [32] D. Haine, I. Dohoo, D. Scholl, S. Dufour, Diagnosing intramammary infection: Controlling misclassification bias in longitudinal udder health studies, *Prev Vet Med* 150 (2018) 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.11.010>.
- [33] C.B. Winder, J.M. Sargeant, D. Hu, C. Wang, D.F. Kelton, S.J. Leblanc, T.F. Duffield, J. Glanville, H. Wood, K.J. Churchill, J. Dunn, M.D. Bergevin, K. Dawkins, S. Meadows, B. Deb, M. Reist, C. Moody, A.M. O'Connor, Comparative efficacy of antimicrobial treatments in dairy cows at dry-off to prevent new intramammary infections during the dry period or clinical mastitis during early lactation: A systematic review and network meta-analysis, *Anim Health Res Rev* 20 (2019) 199–216. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000239>.
- [34] F.C. Campos, I.G. Castilho, B.F. Rossi, É.C.R. Bonsaglia, S.T.A. Dantas, R.C.B. Dias, A. Fernandes Júnior, R.T. Hernandez, C.H. Camargo, M.G. Ribeiro, J.C.F. Pantoja, H. Langoni, V.L.M. Rall, Genetic and Antimicrobial Resistance Profiles of Mammary Pathogenic *E. coli* (MPEC) Isolates from Bovine Clinical Mastitis, *Pathogens* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/pathogens11121435>.
- [35] Z. Rodriguez, V.E. Cabrera, H. Hogeveen, P.L. Ruegg, Economic impact of subclinical mastitis treatment in early lactation using intramammary nisin, *J Dairy Sci* 107 (2024) 4634–4645. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24311>.
- [36] Z. Deng, G. Koop, H. Hogeveen, E.A.J. Fischer, B.H.P. van den Borne, R. van der Tol, T.J.G.M. Lam, Transmission dynamics of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in a Dutch dairy herd using an automatic milking system, *Prev Vet Med* 192 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105384>.
- [37] M.H. Fabres-Klein, M.J. Caizer Santos, R. Contelli Klein, G. Nunes de Souza, A. de Oliveira Barros Ribon, An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*, *BMC Vet Res* 11 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0319-7>.
- [38] T.S. Lopes, P.S. Fontoura, A. Oliveira, F.A. Rizzo, S. Silveira, A.F. Streck, Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis, *Res Vet Sci* 131 (2020) 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>.
- [39] J. Panchal, A. Patel, S. Patel, D. Goswami, Understanding mastitis: Microbiome, control strategies, and prevalence – A comprehensive review, *Microb Pathog* 187 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106533>.
- [40] A.B. Bertolini, A.M. Prado, P.J. Thyssen, M. de Souza Ribeiro Mioni, F.L.R. de Gouvea, D. da Silva Leite, H. Langoni, J.C. de Figueiredo Pantoja, V.M. Rall, F.F. Guimarães, S.F. Joaquim, S.T. Guerra, R.T. Hernandez, S.B. Lucheis, M.G. Ribeiro, Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment, *Lett Appl Microbiol* 75 (2022) 1232–1245.

- <https://doi.org/10.1111/lam.13791>.
- [41] E.T. Tora, N.B. Bekele, R.S.S. Kumar, Bacterial profile of bovine mastitis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis, *PeerJ* 10 (2022). <https://doi.org/10.7717/peerj.13253>.
- [42] M.F. Azooz, S.A. El-Wakeel, H.M. Yousef, Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms, *Vet World* 13 (2020) 1750–1759. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1750-1759>.
- [43] E.M.S. Dorneles, M.D.A.M. Fonseca, J.A.P. Abreu, A.P. Lage, M.A.V.P. Brito, C.R. Pereira, H.M. Brandão, A.S. Guimarães, M.B. Heinemann, Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil, *Microbiologyopen* 8 (2019). <https://doi.org/10.1002/mbo3.736>.
- [44] A. Ashraf, M. Imran, Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis, *Anim Health Res Rev* 21 (2020) 36–49. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>.
- [45] G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps, *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2006) 196–203. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.196-203.2006>.
- [46] H. Panlilio, C. V. Rice, The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms, *Biotechnol Bioeng* 118 (2021) 2129–2141. <https://doi.org/10.1002/bit.27760>.
- [47] A. Almeida, Photodynamic therapy in the inactivation of microorganisms, *Antibiotics* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040138>.
- [48] F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, W. Buchalla, E. Hellwig, A. Al-Ahmad, T. Maisch, Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't, *Crit Rev Microbiol* 44 (2018) 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite bovina é uma doença multifatorial de elevada relevância na pecuária leiteira global, representa um desafio sanitário, econômico e de saúde pública. Associada a uma diversidade de micro-organismos, a doença não apenas compromete a qualidade do leite e bem-estar animal, como também gera prejuízos significativos aos produtores e a indústria láctea. O tratamento convencional, embasado no uso de antimicrobianos, enfrenta um obstáculo relacionado a resistência antimicrobiana, agravada pelo uso de antimicrobianos de forma inadequada e não específica. Esse cenário, aliado ao potencial zoonótico da mastite, expõe riscos à saúde humana, uma vez que cepas multirresistentes presentes no leite podem alterar a microbiota intestinal e desencadear infecções.

Diante desse contexto, medidas preventivas, como higienização rigorosa durante a ordenha, monitoramento sanitário adequado dos rebanhos e a adoção de testes de sensibilidade antimicrobiana, destacam-se como estratégias essenciais para reduzir a incidência da doença. Contudo, os resultados obtidos nesse trabalho apontam para uma alternativa promissora no combate à mastite e à resistência microbiana: a inativação fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Os experimentos demonstraram a eficácia da técnica na fotoinativação de cepas isoladas de mastite bovina, com redução significativa do crescimento bacteriano. Além disso, observou-se um efeito sinérgico em uma cepa de *Escherichia coli* multirresistente, que recuperou a sensibilidade a um antimicrobiano previamente ineficaz. Esse fenômeno sugere que a TFDa modifica as características da membrana bacteriana, potencializando a ação de antimicrobianos convencionais e abrindo caminho para protocolos terapêuticos combinados.

Apesar dos avanços, é necessário estudos complementares para avaliar a aplicabilidade clínica da TFDa. Investigar a toxicidade dos fotossensibilizadores e mapear a citolocalização dessas moléculas em células e em tecidos mamários, são etapas fundamentais para assegurar a segurança e eficácia da técnica *in vivo*. Tais resultados poderão otimizar a TFDa como terapia complementar, reduzindo a dependência de antimicrobianos e combatendo cepas multirresistentes de forma mais específica, já que TFDa não induz mecanismos de resistência.

Nesse sentido, este trabalho reforça a necessidade de abordagens integradas no controle da mastite bovina, combinando práticas tradicionais a tecnologias emergentes. A TFDa surge não apenas como alternativa terapêutica, mas como uma estratégia na luta contra a resistência antimicrobiana, sobretudo, na interseção saúde animal, saúde humana e saúde ambiental em um contexto de *One Health*.