

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

Tratamento de Mastite Subclínica utilizando Terapia
Fotodinâmica (PDT)

Lívia Helena Moreira da Silva

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TRATAMENTO DE MASTITE SUBCLÍNICA UTILIZANDO TERAPIA
FOTODINÂMICA (PDT)**

LÍVIA HELENA MOREIRA DA SILVA

Sob a Orientação do Professor
José Carlos Pereira de Souza

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2009

636.20896

S586d Silva, Livia Helena Moreira da, 1974-

T Tratamento de mastite subclínica
utilizando terapia fotodinâmica (PDT) /
Livia Helena Moreira da Silva - 2009.

83 f. : il.

Orientador: José Carlos Pereira de
Souza.

Tese (Doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

Bibliografia: f. 56-65

1. Bovino - Doenças - Teses. 2.
Mastite - Tratamento - Teses. 3. Leite
- Qualidade - Teses. 4. Glândulas
mamárias - Teses. I. Souza, José
Carlos Pereira de, 1947-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

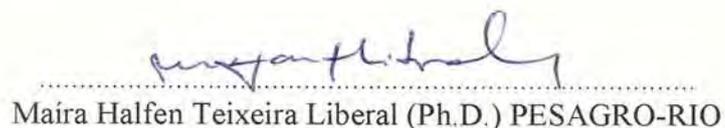
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

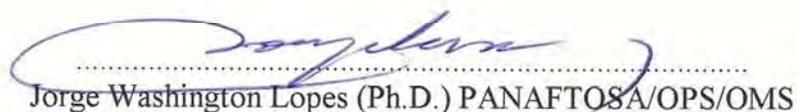
LÍVIA HELENA MOREIRA DA SILVA

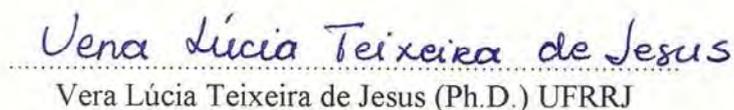
Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração Sanidade Animal.

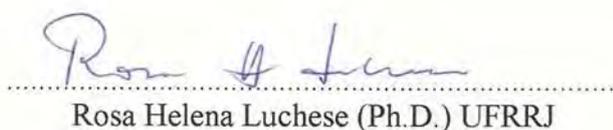
TESE APROVADA EM 27/02/2009.


.....
José Carlos Pereira de Souza (Ph.D.) MAPA/UFRRJ
(Orientador)


.....
Maira Halfen Teixeira Liberal (Ph.D.) PESAGRO-RIO


.....
Jorge Washington Lopes (Ph.D.) PANAFTOSA/OPS/OMS


.....
Vera Lúcia Teixeira de Jesus (Ph.D.) UFRRJ


.....
Rosa Helena Luchese (Ph.D.) UFRRJ

**“O hoje bem vivido faz de todo ontem um sonho de felicidade
e de todo o amanhã uma visão de esperança.”
(autor desconhecido)**

Ao meu filho Caetano Moreira Mélo
pelo Verdadeiro Valor da Vida.

A avó Maria Hortênsia Camargo de Mattos
(in memorium)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Leonardo Alves de Mélo,
por todo amor, carinho, paciência e dedicação.

Aos meus pais Eduardo Moreira da Silva e Regina Helena Moreira da Silva,
pela amizade e educação que deram a mim e as minhas irmãs, sempre nos apoiando
e incentivando em todos os momentos de nossas vidas.

As minhas irmãs, Silvia Helena Moreira da Silva, Flávia Helena Moreira da Silva e Maria
Hortênsia Moreira da Silva e ao sobrinho Eduardo Moreira da Silva Neto
pelo incentivo, companheirismo e amizade.

À toda minha família, pela amizade e convivência agradável.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Carlos Pereira de Souza, por acreditar na proposta deste projeto e ter aceitado o desafio.

Ao Professor Dr. Renato Amaro Zângaro pela amizade e sabedoria para co-orientar me nos momentos necessários.

Ao Professor Dr. Lima por ter projetado a fibra de acrílico para o experimento;

Ao senhor Fernando representante da empresa MMOptics® pelo empréstimo do aparelho FISIOLED®;

Ao senhor Luiz Augusto Lupato Conrado representante da empresa STARLASER® pelo empréstimo do aparelho MICRODONT®;

Aos funcionários Celso Erasmo de Oliveira e Laércio Cesar de Oliveira, oficina óptica da Universidade do Vale do Paraíba que fabricaram as ponteiras de acrílicos;

Ao proprietário da fazenda Augusto Marques e seus funcionários que possibilitaram a execução dos experimentos a campo;

Ao Professor Dr. Miguel pelos exames histológicos e pelos questionamentos do grupo de pesquisas sobre o PDT na UNESP/ SJC-SP;

Ao Ms Laerte Cassoli gerente responsável pela Clínica do Leite (ESALQ-USP) pelos esclarecimentos e questionamento crítico sobre os exames;

A Dra. Carmem Quaglia e equipe pela realização dos exames solicitados;

Ao Mv. Ademar responsável pelo Frigorífico Mantiqueira que possibilitou os experimentos no matadouro;

Ao Professor Dr. Nicolau Maués Serra-Freire pela ajuda nos cálculos estatísticos e por estar sempre presente nos momentos de crescimento profissional;

Aos Professores Dr. Raduan Hage e Ms. Kátia Calligaris pelos questionamentos críticos para o desenvolvimento da tese e no grupo de pesquisa sobre o Laser e seus benefícios na UNIVAP-SP;

As minhas amigas de pós-graduação, em especial a Shana Oliveira Coelho, Arisa Mandarino, Ana Paula Moraes e Ana Luiza Poerner pelo companheirismo e por dividir alegrias e ansiedades.

Aos amigos Valério Amaral Moretti e Heloiza Helena de Oliveira Amaral Moretti pelas correções e sugestões em metodologia.

Aos professores e funcionários da UFRRJ, por tornar possível e agradável a minha estada nesse curso.

Aos meus familiares, especialmente a família Moreira da Silva e Alves de Melo, pelo apoio nas horas difíceis.

A todos que contribuíram, de maneira direta ou indireta, para a execução deste trabalho.

RESUMO

MOREIRA DA SILVA, Livia Helena. **Tratamento de mastite subclínica utilizando Terapia Fotodinâmica (PDT)**. Seropédica: UFRRJ, 2009. 65p. (Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

Foram realizados vários experimentos para adequar à técnica terapia fotodinâmica (PDT) para o tratamento de mastite subclínica em bovinos. Foram avaliados dois aparelhos de LEDs adaptados com fibra de acrílico para a penetração nos tetos. Varias densidades de energia foram testadas para o efeito desejado com o desenvolvimento de uma metodologia própria. A terapia fotodinâmica utilizando baixa densidade de energia para tratar mastite subclínica foi eficiente posto que, houve redução na infecção nos quartos mamários tratados. As adaptações para adequação dos aparelhos LEDs para tratamento dos tetos afetados com mastite subclínica em bovinos foi eficiente permitindo que a irradiação atingisse todo interior do quarto mamário tratado. O agente fotossensibilizante azul de toluidina a 2,5% foi capaz de desencadear o efeito desejado permitindo a dispersão da luz e estimulando resposta antimicrobiana. As densidades de energia (DE) testadas reduziram os principais agentes microbianos isolados. *Staphylococcus* coagulase positivos foi eliminado com DE 25J/cm², Estafilococos coagulase negativos com DE 75J/cm², *Bacillus* sp. com DE 100J/cm² e *Streptococcus dysgalactiae* diminuiu na contagem bacteriana total quando se utilizou DE 200J/cm².

Palavras-chave: glândula mamária, LASER, fotossensibilizantes, azul de toluidina, histologia.

ABSTRACT

MOREIRA DA SILVA, Livia Helena. **Treatment of subclinical mastitis through the Photodynamic Therapy (PDT)**. Seropédica: UFRRJ, 2009. 65p. (Theory of Doctorate in Veterinary Sciences, Animal Health).

Experiments were carried out to adapt the technical photodynamic therapy (PDT) to the subclinical mastitis treatment in bovine. Two LEDs equipments were tested with manufactured acrylic fibers to penetration in the teats. Different energy densities were tested to development the methodology. The photodynamic therapy using low energy density was efficient to treat subclinical mastitis, it can be seen the reduction of mammary infection. The constructions the acrylic fibers to LEDs equipments were efficient, where it was possible to reach all interior of the mammary treated. The toluidine blue at 2,5% was efficient to light dispersal and in microbial activity. The energy densities (ED) used was efficient to the principal microbial agents of subclinical mastitis found in the present work. *Staphylococcus* coagulase positive was removed with ED 25J/cm², *Staphylococcus* coagulase negative were removed with ED 75J/cm², *Bacillus* sp was removed with ED 100J/cm², *Streptococcus dysgalactiae* bacterial total count was reduced when ED 200J/cm² was used.

Key words: mammary gland, LASER, photosensitizers, toluidine blue, histology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais agentes fotossensibilizadores (FS), corantes, suas respectivas bandas de absorção.	13
Tabela 2: Representação dos grupos 1, 2, 3 e 4 e a relação das amostras que participaram de cada grupo.	26
Tabela 3: Frequência dos dados encontrados em relação a vacas e tetos.	31
Tabela 4: Número de exames (CMT) realizados correlacionando o grau de positividade.	31
Tabela 5: Distribuição dos microrganismos isolados nas amostras de leite infectadas.	32
Tabela 6: Determinação das Intensidades de potências de raio laser na proveta vazia, com leite sem e com fotossensibilizante (azul de toluidina) a 2,5%.	34
Tabela 7: Grupos tratados com PDT <i>in vivo</i> , a cada 48h, com diferentes densidades de energia, para o tratamento de mastite subclínica.	37
Tabela 8: Grupos tratados com PDT <i>in vivo</i> a cada 24h e 12h com a densidade de energia (75 J/cm ²) no tratamento de mastite subclínica.	37
Tabela 9: Identificação dos microrganismos isolados nas diferentes densidades de energia com intervalo de 48h entre os tratamentos.	45
Tabela 10: Identificação dos microrganismos isolados na densidade de energia de 75 J/cm ² com tratamento de 24/24 horas.	46
Tabela 11: Identificação dos microrganismos isolados na densidade de energia de 75 J/cm ² com tratamento de 12/12 horas.	46
Tabela 12: Isolamento dos microrganismos em várias amostras em grupos de tratamentos distintos utilizando várias concentrações do agente fotossensibilizante.	49
Tabela 13: Número de microrganismos isolados nos seus respectivos grupos de tratamentos em todas as fases.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ordenha com balde ao pé, em um primeiro instante, na fazenda	18
Figura 2: Ordenha em espinha de peixe (2x6), no segundo momento.	18
Figura 3: Aparelho de laser FISIOLED® da MMOptics® com ponteira de acrílico adaptada	19
Figura 4: Aparelho de laser STARLASER® da Microdont® com ponteira de acrílico adaptada.	19
Figura 5: Desenho esquemático da ponteira de acrílico.	20
Figura 6: Fabricação da ponteira de acrílico na oficina Óptica da UNIVAP.	20
Figura 7: Inspeção e numeração dos quartos mamários.	22
Figura 8: Introdução do azul de metileno a 1% por sonda uretral.	22
Figura 9: Aplicação do laser MMOptics® com o teto relaxado.	22
Figura 10: Colheita de amostra de material para a histologia.	23
Figura 11: Início do tratamento com a introdução da sonda uretral injetando azul de toluidina a 2,5%, após a ordenha.	24
Figura 12: Primeiro nível do tratamento com o PDT, tentando-se chegar próximo ao parênquima glandular.	24
Figura 13: Segundo nível do tratamento com o PDT na ponta do teto relaxado.	25
Figura 14: Aplicação <i>in vitro</i> de 200J/cm ² em segundo nível do grupo 2 usando azul de toluidina a 2,5%.	27
Figura 15: Aplicação <i>in vitro</i> de 200J/cm ² em segundo nível do grupo 3.	27
Figura 16: Vaca tratada no matadouro a 24 horas antes do abate.	28
Figura 17: Úbere de animal tratado no matadouro 24 horas depois, avaliação macroscópica do teto tratado através do PDT e teto controle.	29
Figura 18: Aferição dos aparelhos testados MMOptics® e Microdont®.	33
Figura 19: Aspecto anatomopatológico do úbere fresco irradiado em diferentes densidades de energia.	34

- Figura 20:** Corte histológico do teto 1 que recebeu densidade de energia $25\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 5x e 20x respectivamente, processo inflamatório característico de mastite subclínica. 35
- Figura 21:** Corte histológico do teto 2 que recebeu densidade de energia $50\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 20x, processo inflamatório característico de mastite subclínica com secreção dentro dos alvéolos com a presença de polimorfonucleares. 35
- Figura 22:** Corte histológico do teto 3 que recebeu densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento de 20x, processo inflamatório crônico com aspectos característicos de mastite clínica. 36
- Figura 23:** Corte histológico do teto 4 que recebeu densidade de energia $100\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 10x e 20x respectivamente, epitélio íntegro com bastantes células inflamatórias, alvéolos atípicos com células e núcleos achatados, caracterizando uma degeneração. 36
- Figura 24:** Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $25\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 38
- Figura 25:** Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $50\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 38
- Figura 26:** Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia de $75\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 39
- Figura 27:** Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia de $100\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 39
- Figura 28:** Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$ intervalo de 12h entre as aplicações. 40
- Figura 29:** Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$ intervalo de 24h entre as aplicações. 40

- Figura 30:** Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia de $25\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 41
- Figura 31:** Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $50\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 42
- Figura 32:** Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 42
- Figura 33:** Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $100\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações. 43
- Figura 34:** Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$ e intervalo de 24h entre os tratamentos. 43
- Figura 35:** Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$ e intervalo de 12h entre as aplicações. 44
- Figura 36:** Comparação entre os dois métodos de contagem bacteriana, placa e citometria de fluxo, *in vitro* utilizando densidade de energia $200\text{J}/\text{cm}^2$ e em diferentes concentrações do agente fotossensibilizante. 47
- Figura 37:** Comparação dos resultados *in vitro* utilizando densidade de energia $200\text{J}/\text{cm}^2$ em diferentes concentrações do agente fotossensibilizante para a Contagem de Células Somáticas (CCS). 48
- Figura 38:** Comparação das médias entre os tratamentos utilizados para a mastite subclínica, utilizando densidade de energia $200\text{J}/\text{cm}^2$ *in vivo*. 50
- Figura 39:** Corte histológico do teto controle em aumento 5x e 20x respectivamente, epitélio folicular variando de cúbico baixo a cúbico alto com células vacuolizadas e grande número de células mononucleares, caracterizando um severo processo inflamatório. 53
- Figura 40:** Corte histológico do teto controle em aumento 40x, alvéolos contendo secreções no interior com frequentes polimorfonucleares e presença de calcificações. 53

Figura 41: Corte histológico do teto tratado que receberam densidade de energia $200\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 5x e 10x respectivamente, alvéolos com secreções, mas sem a presença ou de poucos polimorfonucleares, revestidos de células cubóides uniformemente distribuídos com pequeno número de calcificações. 53

Figura 42: Corte histológico do teto tratado que recebeu densidade de energia $200\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 20x e 40x respectivamente, caracterizando um processo inflamatório severo para moderado em 24h após o tratamento. 54

LISTAS DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

<i>A</i>	Amplitude
A	rea
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem Células Somáticas
<i>DE</i>	<i>Densidade de Energia ou Fluência</i>
<i>DP</i>	<i>Densidade de Potência ou Irradiância</i>
<i>E</i>	<i>Energia</i>
FS	Fotossensibilizantes
<i>f</i>	Frequência
Hz	Hertz
J	Joules
mW	miliwatts
nm	nanmetro
PDT	Terapia Fotodinâmica
<i>P</i>	Potência
T	tempo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
W	Watts
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico das mastites bovinas	3
2.2 Agentes etiológicos da mastite	6
2.3 Prevalência da mastite	6
2.4 Qualidade do leite	7
2.4.1 Contagem Bacteriana	7
2.4.2 Contagem de Células Somáticas (CCS)	8
2.5. Programas de controle de mastite	8
2.6. LASER (Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation)	9
2.6.1 Características do Laser	9
2.6.2. Interação Laser com o Tecido Biológico	10
2.6.3 Classificação dos Lasers, segundo seus efeitos	11
2.7. Terapia Fotodinâmica (PDT)	12
2.7.1. Fotossensibilizantes (FS)	13
2.7.2. Mecanismos do PDT	14
2.7.3. Utilização do PDT nos microorganismos	14
2.8. LASER e Mastites	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Seleção dos animais	17
3.2 Ordenha	17
3.3 Equipamentos de Laser	18
3.4. Parte I – Pilotos Experimentais	20
3.4.1. Experimentos para testar as ponteiras de acrílico adaptadas	20
3.4.1.1. Comparação dos dois aparelhos (experimento <i>in vitro</i>)	20
3.4.1.2 Experimento em peça fresca de matadouro	21
3.4.2 Experimentos para Determinar a Densidade de Energia (DE)	23
3.4.2.1 Experimento <i>In Vivo</i> , para tratamento de mastite subclínica, através do PDT com o intervalo de 48h entre as aplicações	23
3.4.2.2 Experimento <i>In Vivo</i> , para tratamento de mastite subclínica, através do PDT com o intervalo de 12h e 24h entre as aplicações.	25

3.4.2.3 Experimento <i>In Vitro</i> ,em leite mastítico, com Densidade de Energia de 200 J/cm ² em três níveis, e uma única aplicação com diferentes concentrações do agente fotossensibilizante	26
3.5.Parte II - Experimentos do Tratamento	27
3.5.1.Tratamento da Mastite Subclínica através da Terapia Fotodinâmica (PDT)	27
3.5.2. Tratamento da Mastite Subclínica através da Terapia Fotodinâmica (PDT) em animal de matadouro	28
3.5.3 Procedimento Laboratorial	29
3.5.4 Procedimento Histológico	30
3.6. Análises Estatísticas	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Parte I – Resultados dos Pilotos Experimentais	33
4.1.1.Experimentos para testar as ponteiras de acrílico adaptadas	33
4.1.1.1 Comparação entre os dois aparelhos (experimento <i>in vitro</i>)	33
4.1.1.2. Resultados Histológicos em Peça Fresca de Matadouro	34
4.1.2. Experimentos para Determinar a Densidade de Energia (DE)	36
4.1.2.1. Experimento <i>In Vivo</i> , para tratamento de mastite subclínica, através do PDT com o intervalo de 48, 24 e 12h entre as aplicações	36
4.1.2.2 Contagem Bacteriana Total (CBT)	37
4.1.2.3. Contagem de Células Somáticas (CCS)	41
4.1.2.4. Microrganismos Isolados	44
4.1.2.5. Experimento <i>In Vitro</i> , em leite mastítico, com Densidade de Energia de 200 J/cm ² em três níveis e uma única aplicação com diferentes concentrações do agente fotossensibilizante	47
4.1.2.5.1 Contagem de Bacteriana Total (CBT)	47
4.1.2.5.2. Contagem de Células Somáticas (CCS)	48
4.1.2.5.3 Microorganismos Isolados	49
4.2. Parte II- Resultado do Tratamento da Mastite Subclínica através da Terapia Fotodinâmica (PDT)	49
4.2.1 Contagem Bacteriana Total dos animais tratados com mastite subclínica através do PDT.	49
4.2.2. Resultados Histopatológicos	52
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

O crescimento cada vez maior da industrialização e a existência de um mercado globalizado vêm exigindo, dos produtores rurais, a utilização de modernas tecnologias ligadas à produção animal. Atualmente, um empreendimento agropecuário lucrativo deve utilizar técnicas e metodologias que visem à otimização do sistema produtivo.

A mastite bovina é uma doença que tem sido estudada desde o século XVIII e, mesmo na atualidade, com muitos estudos sobre a patologia, ainda é a doença de maior impacto econômico na produção leiteira. Apresenta alta prevalência nos rebanhos do mundo inteiro e estimam-se perdas anuais de aproximadamente 35 bilhões de dólares (WELLENBERG et al., 2002).

Nos Estados Unidos, o custo anual, com mastite, tem sido estimado em 1,5-2,0 bilhões de dólares. Deste montante, 960 milhões são com a perda do leite pela mastite subclínica associada ao aumento de células somáticas. Pelo fato de não desencadear reações inflamatórias extensas do tecido afetado, a mastite subclínica, além de ser a forma mais frequente, proporciona os maiores prejuízos ao produtor e à indústria de laticínios, uma vez que causa “silenciosa” redução da capacidade de secreção láctea do quarto mamário afetado em níveis que variam de 11,4% a 45,5% (PHILPOT, 1984; GONZALEZ et al. 1988), correspondendo ao impacto econômico, no Brasil, em média a US\$ 329,34/vaca/ano (COSTA, 1998).

Os programas de controle da mastite visam diminuir a prevalência da doença a níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é viável segundo os autores SILVA et al. (1998).

Entre as medidas recomendadas para o controle das mastites produzidas pela maioria dos organismos incluem-se as medidas higiênicas. Esses procedimentos, entretanto, não são eficazes contra as infecções intramamárias (IIM) produzidas por microrganismos de origem ambiental ou oportunistas. Encurtar a duração dessas infecções é um importante componente dos programas de controle de mastites, o que pode ser feito por meio de tratamentos das mastites subclínicas durante a lactação.

As tecnologias modernas, na produção leiteira, implicam uma dependência cada vez maior do uso de substâncias químicas como medicamentos de uso veterinário, dentre estes, pela relevância do assunto, os antimicrobianos usados no tratamento das mastites.

O uso desses medicamentos pode produzir resíduos nos diferentes produtos de origem animal, sendo que o *Codex alimentarius* da FAO/OMS questiona a presença, o tipo e a concentração desses resíduos encontrados nos alimentos destinados ao consumo humano, o que pode, sob o ponto de vista toxicológico, promover resistência bacteriana no animal e consequentemente, de forma indireta, no Homem (PALERMO-NETO, 2001).

Quando se pensa em tratamento para mastite subclínica deve sempre ser levado em consideração o custo, o tempo de eliminação dos medicamentos e a perda de leite. Assim, recomenda-se o menor número de aplicações visando à cura dos animais e o rápido retorno da produção normal do leite.

Das novas tecnologias empregadas na odontologia e na medicina moderna surgiu o tratamento denominado terapia fotodinâmica (PDT) que consiste na utilização do raio laser aplicado junto a um corante fotossensível, para curar algumas patologias.

Utilizado inicialmente em tumores e mais recentemente em microrganismos, como as bactérias, esta terapia tem duas grandes vantagens sobre antissépticos e antimicrobianos convencionais: primeiro, como nenhum dos dois componentes do sistema (luz e corante fotossensibilizante) é inerentemente bactericida, o efeito antimicrobiano seria limitado para regiões luz-irradiadas em áreas que foram tratadas com fotossensibilizante; a segunda, e talvez a mais importante, o desenvolvimento de resistência para fotoquímica induzindo morte à qual

é mediada predominantemente por oxigênio singleto, seria improvável (WAINWRIGHT, 1998).

Utilizando esta técnica, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de tratamento da mastite subclínica por meio da terapia fotodinâmica, com a utilização de laser de baixa potência e corante fotossensível, como uma alternativa de tratamento em relação à terapia convencional, sem deixar resíduos no leite além de retorno rápido do animal à produção. Os objetivos específicos foram desenvolver um mecanismo capaz de guiar a luz irradiada para dentro do teto infectado, determinar a concentração ideal do agente fotossensibilizante utilizado *in vivo* para desencadear o efeito desejado e a densidade de energia capaz de estimular o agente fotossensibilizante levando a morte do microrganismo causador da mastite subclínica *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico das mastites bovinas

No século XVIII, considerava-se que as enfermidades da glândula mamária dos bovinos eram causadas por picadas de insetos ou pelo contato com o sangue ou secreções de feridas supuradas (VON WILLBURG, 1787).

Acreditava-se ainda que uma das causas determinantes das moléstias que acometiam a glândula mamária era a influência de ocorrências fantasmagóricas ou maus espíritos. Por essa razão, os assim denominados “mal do espírito” eram tratados e curados com “reliquias, água benta ou desinfetante natural”, conforme relatos de VON WILLBURG (1787) que iniciou os estudos com bases científicas das doenças da mama, quando organizou e publicou um manual para a orientação dos fazendeiros, descrevendo os diferentes tipos de mastites, definindo-as como variadas formas de inflamações da glândula mamária. Todavia, o empenho dos especialistas à época estava voltado apenas para a nosologia das moléstias da glândula mamária, não abordando a etiopatogenia dessas enfermidades.

O interesse demonstrado por veterinários e criadores de gado leiteiro determinou o início de uma nova era no estudo da patologia da glândula mamária, pela necessidade prática e científica das classificações das mastites. RYCHNER (1835) classificou as mastites em ativa, passiva e reumática, porém, HAUBNER (1867) o fez em diferentes formas clínicas, ou seja, superficial, profunda, parenquimatosa e forma grave de mastite.

VON FRANCK (1876) foi o pioneiro em pesquisas relativas à etiologia infecciosa das mastites mas, apesar de ter demonstrado a existência de microrganismos em amostras de leite oriundas de glândulas enfermas, não determinou quais seriam esses agentes etiológicos.

Na investigação dos agentes causadores das mastites, ESCHERICH (1885) descreveu os primeiros germes coliformes como sendo um dos possíveis agentes etiológicos causadores das mastites.

NOCARD & MOLLEREAU (1885) evidenciaram o microrganismo *Streptococcus* em amostras de leite colhido de quartos mamários acometidos por mastite. KITT & GLACE (1908) ao estudarem surtos de mastites em rebanhos leiteiros, determinaram que o agente etiológico das infecções mamárias fosse por microrganismos do gênero *Streptococcus* e propuseram dar-lhe o nome de *Streptococcus agalactiae contagiosae*, em substituição a *Streptococcus nocardii*.

Ainda em 1908, esses autores avaliaram a patogênese, os sinais e as alterações anatômicas e funcionais das mastites, classificando-as em mastites infecciosas e não infecciosas; considerando o quadro sintomático, classificou-as em edema inflamatório, mastite catarral crônica e mastite tuberculosa crônica; utilizando os critérios anatomopatológicos, classificaram as formas de mastite em edematosa do tipo infeccioso e não infeccioso, catarral esporádica, enzoótica catarral e, por último, em infecciosa purulenta esclerosante.

POELS (1910) apresentou a primeira classificação etiológica das mastites baseada nos agentes etiológicos que as produziam como piobacilose, colibacilose, pseudobacilose, streptomicose, staphylomicose, pasteurelose, piocianose, necrobacilose; actinomicose e tuberculose.

HESS (1911) caracterizou a mastite como um processo infeccioso que poderia variar em suas manifestações, quanto à intensidade dos sintomas e à evolução da doença, dividindo-a em seis formas clínicas: mastite simples (sintomas de pequena intensidade), mastite flegmonosa (sintomatologia grave), mastite recidivante, mastite metastática, mastite necrótica e mastite traumática.

Mas, foi GÖTZE (1931) que classificou, pela primeira vez, as mastites, obedecendo aos critérios propostos pela Propedêutica Veterinária, ou seja, pelo exame do leite e pela avaliação criteriosa das características físicas da mama (volume, deformações, lesões e

alterações de consistência, bem como sensibilidade da mama) e dessa forma, detectando as alterações pela inspeção, avaliação por palpação dos tetos e de seus tecidos constituintes.

Seguindo esta linha de raciocínio, SCHALM et al. (1971), apresentaram uma classificação, segundo as formas clínicas de manifestação, de quatro tipos: hiperaguda, aguda, subaguda e subclínica. Todavia, os critérios mencionados como básicos para esta classificação referiam-se ao tipo de evolução da doença e não à forma clínica. Assim, na mastite hiperaguda, manifestaram-se os seguintes sintomas: hiperemia, rubor, calor, edema, alteração da função e síndrome da febre. Na forma aguda, os mesmos sinais da inflamação eram evidenciados, distinguindo-as pelo tempo de evolução. Quando do processo de apresentação hiperaguda ou aguda desapareciam os sintomas do quadro inflamatório, permanecendo a perda da função, a mastite era classificada como subaguda. Nos casos em que houvesse permanência do aumento da celularidade no leite, ocorreria a forma subclínica, entretanto, essa última denominação não poderia representar um dos itens de classificação de formas clínicas de uma doença. Cabe ressaltar que, no processo instalado, sempre existiram sinais clínicos evidentes que poderiam ser detectados pelo exame clínico, auxiliado pela diminuição da produção leiteira, pelo pH alcalino do leite, pelo aumento dos teores de cloreto e do número de células somáticas, predominando os polimorfonucleares neutrófilos.

WEIGT (1973) enfocou as mastites segundo as diferentes formas clínicas, apontando as três formas mais comuns de mastites: catarral, apostematosa e flegmonosa. Esses três tipos poderiam apresentar diferentes formas de evolução: aguda ou crônica. Ressaltou, entretanto, que as formas catarrais poderiam apresentar a evolução aguda e crônica; as flegmonosas seriam sempre agudas e as apostematosas, crônicas.

No período de 1971-1987, a INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1987) (Federação Internacional de Produtores de Leite- IDF) apresentou e recomendou uma definição das inflamações da glândula mamária baseada em dois conceitos: avaliação do número de células somáticas e isolamento de patógenos de amostras de leite.

Em 1987, na publicação “Animal Pharm-Bovine Mastitis”, foram apresentados e avaliados os métodos de diagnóstico de mastites recomendados pela IDF, considerando insatisfatórios os critérios anteriormente aceitos e recomendados até então tidos como fundamentais para a perfeita definição e conceituação dos processos inflamatórios da glândula mamária. Tal desconsideração dos princípios definidores da inflamação da glândula mamária alicerçou-se em dois fatos: primeiro, os testes existentes recomendados falhavam no isolamento e identificação das bactérias, que são os agentes etiológicos determinantes das mastites; segundo, o número de células somáticas variava de maneira significativa em diferentes condições fisiológicas. Por isso, a referida Federação deu destaque às formas de mastites designadas como mastites subclínicas, afirmando categoricamente “A maioria das mastites são subclínicas e, muito embora as bactérias estejam presentes, as manifestações observadas na glândula mamária não são detectadas pelos pecuaristas. Estas mastites, entretanto, reduzem o volume de leite produzido no quarto afetado e modificam a composição do leite”. Assim, o conceito de mastite subclínica demonstrou eficiência para o controle das mastites com reais benefícios ao exercício da clínica veterinária, ao bem-estar animal ou à evolução do estudo da etiopatogenia das inflamações da glândula mamária (IDF, 1987).

WELBORN (1994) caracterizou as mastites segundo a etiologia do processo infeccioso da glândula mamária, definindo como mastite causada por coliformes (formas agudas e hiperagudas); mastite gangrenosa (causada por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Pasteurella multocida* ou *Pasteurella haemolytica*) e mastite contagiosa causada por *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *S. aureus*. Chamou a atenção sobre a imperfeição do critério inicialmente proposto para a sua classificação, posto que a modalidade de mastite “gangrenosa” faz referência a uma manifestação clínica bem caracterizada pela lesão anatomopatológica, sendo que, esse tipo de mastite poderia ser determinado por um

agente etiológico considerado causador de mastite “contagiosa” e essa condição de ser uma forma contagiosa de mastite, estariam relacionados diretamente com a epidemiologia da doença e não com as manifestações da doença.

WENDT et al. (1994) classificaram as mastites pela avaliação histopatológica, associando a forma clínica e o agente etiológico, permitindo assim identificar cinco formas inespecíficas de mastites e cinco formas granulomatosas. As formas nas quais não foi possível estabelecer uma relação direta entre a ação do agente etiológico e os principais sintomas da mastite foi denominado forma inespecífica, recomendando que sua classificação obedecesse aos critérios clínicos. Nesse grupo, figuraram a mastite catarral aguda, mastite catarral crônica, mastite necrótica hemorrágica, mastite apostematosa e a mastite intersticial não purulenta. Para esse estudo de classificação, procederam ao isolamento e identificação do agente etiológico da mastite, bem como estabeleceram a caracterização histopatológica das lesões, mas os autores relatam ainda que as diferentes formas de classificação tivessem mais um caráter meramente didático, contrapondo-se assim às opiniões de outros estudiosos do assunto que consideraram ser a classificação, a base para a elaboração de diagnósticos nosológicos e etiológicos exatos e precisos, quando possíveis para contribuir com recomendações de medidas terapêuticas e profiláticas adequadas para combater e controlar a doença.

LANGONI (2000) classificou as mastites de acordo com características dos patógenos envolvidos na inflamação da glândula mamária, podendo ser classificadas em contagiosas e ambientais. A mastite contagiosa refere-se à causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e está associada às expressivas elevações no número de células somáticas contadas (CCS), com maior número de casos subclínicos. Esta forma ocorre devido à disseminação dos patógenos entre vacas pelo leite, pelas mãos dos ordenhadores e no equipamento de ordenha contaminado. Na mastite ambiental, em que os agentes compartilham do mesmo ecossistema da vaca, como o solo, piso, cama, esterco e matéria orgânica, são encontrados os microrganismos *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae*, *Prototheca* sp. e *Actinomyces pyogenes*, que estão presentes com maior frequência na forma clínica da doença e não estão associados a um grande aumento na CCS. A sua transmissão, embora possa acontecer também durante o processo de ordenha devido às falhas higiênicas no processamento, sua ocorrência se dá principalmente entre ordenhas, sendo, portanto de difícil controle, pois os principais agentes estão disseminados no ambiente onde os animais permanecem.

GREGORY et al. (2001) relataram que, apesar da evolução dos estudos relacionados à patogênese e etiologia das mastites no último quarto do século XX, a classificação das mastites ficou baseada nos padrões da Propedêutica Médico Veterinário que permite, por meio das manifestações clínicas presentes nas inflamações dos tecidos da mama, uma perfeita orientação diagnóstica e real condução da terapia indicada.

As classificações definidas fizeram-se de acordo com os critérios a seguir detalhados: Anatomopatológico, por lesões detectadas em exames histopatológicos, que não são rotineiros em clínica (GREGORY et al. 2001); Microbiológico, com o isolamento do agente etiológico determinante da mastite, porém não é rotina na avaliação das condições da glândula mamária (SCHALM et al., 1971; IDF, 1987); Microbiológico/Epidemiológico, caracterizando mastites contagiosas e ambientais – a definição desses tipos de mastites dependeria do isolamento do agente etiológico e da real conceituação dos “habitats” desses agentes (CULLOR et al., 1990); Patogenicidade dos agentes etiológicos, caracterizando em patógenos maiores e menores e, para isso, são necessários o isolamento e a definição do agente etiológico (RADOSTITIS et al., 1994). Pela evolução da doença: classificar-se-iam as mastites em: superaguda, aguda,

subaguda, crônica e subclínica, onde se deveriam identificar as manifestações clínicas e o momento da instalação da enfermidade, para avaliar a evolução (GREGORY et al. 2001).

Ainda GREGORY et al. (2001) avaliando o exercício da prática médico-veterinário no diagnóstico, tratamento e profilaxia das mastites, determinaram que estas sejam classificadas em quatro formas: mastite catarral, aguda ou crônica, caracterizada por modificações do aspecto do leite apresentando grumos; mastite flegmonosas, sempre de evolução aguda, caracterizada por intensa sintomatologia sistêmica e transformação do leite em secreção sero-sanguinolenta; mastite apostematosas, usualmente crônica em sua evolução caracterizada pela transformação do leite em secreção purulenta e distúrbio da secreção láctea, caracterizada por aumento da celularidade e/ou do pH do leite, representando casos de mastites que mereçam elucidação posterior e avaliação da evolução do caso, infecções latentes e/ou inflamações inespecíficas, causadas por retenção de leite, traumatismo da ordenha ou condições fisiológicas específicas. Nesses casos, as vacas deveriam ficar em observação e serem submetidas a melhorias do manejo da ordenha e, em condições ideais, posteriormente, estabelecer-se-ia um diagnóstico definitivo.

2.2 Agentes etiológicos da mastite

Embora a mastite ocorra esporadicamente em todas as espécies de mamíferos, ela assume maior importância econômica nos bovinos leiteiros, por ser esta espécie de animal mais explorado pelo homem nesta modalidade de produção (BLOOD & RADOSTITIS, 1989).

NADER FILHO et al. (1985) relataram que existem aproximadamente 137 espécies de diferentes microrganismos associados às infecções intramamárias em bovinos leiteiros, sendo evidenciado a maior frequência de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, mas vários outros gêneros são apontados como causas de mastites: *Campylabacter*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Mycoplasma*, *Nocardia*; infecções por fungos: *Trichosporon*, *Aspergillus*, *Pichia*, leveduras como *Candida*, *Criptococcus*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e ainda pela alga *Prototheca*.

Os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite bovina podem ser classificados em patógenos “maiores” e “menores”. Na primeira categoria estão incluídos os agentes que provocam aumento na Contagem Células Somáticas (CCS), alterações significativas na composição do leite e conseqüentemente grandes impactos econômicos. Os principais patógenos “maiores” são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Actinomyces pyogenes* e *Serratia* sp.. Estafilococos coagulase negativos e *Corynebacterium bovis* são considerados patógenos “menores” e promove inflamação moderada com CCS de, no máximo, duas a três vezes superiores a dos quartos mamários sadios (HARMON, 1994; LAFFRANCHI, et al. 2001).

2.3 Prevalência da mastite

O conhecimento da cadeia epidemiológica desta enfermidade é o passo fundamental para que sejam aplicadas as medidas profiláticas (SCHALM et al., 1971). LANGONI et al. (1984) observaram que, em vacas leiteiras, a mastite responde por 38% de morbidade dentro de um rebanho, sendo que cerca de 7% dos animais acometidos são descartados e 1% morre em conseqüência da infecção.

Além de ser o maior problema sanitário relacionado à pecuária leiteira, também é responsável por grandes prejuízos econômicos decorrentes da diminuição da qualidade, produção de leite, dos gastos com medicamentos, assistência veterinária e com a reposição de animais (COSTA, 1991).

COSTA et al. (1995a) relataram os índices de ocorrência de mastite subclínica e clínica da ordem de 72% e de 17,5% nos estados de Minas Gerais e São Paulo respectivamente. RIBEIRO et al. (2003) avaliaram a prevalência na região sul do Rio Grande do Sul da mastite clínica e subclínica infecciosa e não infecciosa, utilizando o teste da caneca telada e o CMT onde relataram os índices de 1,48% de mastite clínica e 37,69% para a mastite subclínica. Os autores ainda relataram que de acordo com a intensidade da reação do CMT foram classificados em + (leve), ++ (moderada) e +++ (intensa) obtendo-se, como resultado 32,12%, 34,39% e 33,49%, respectivamente; e na análise microbiológica 64,56% das amostras, cresceram 18,27% (+), 22,00% (++) e 24,29% (+++).

2.4 Qualidade do leite

Vários programas foram propostos para diminuir a ocorrência de mastite em vacas e entre as principais medidas estão o monitoramento dos índices de mastite, pré e pós imersão dos tetos em solução anti-séptica, conforto ambiental, tratamento das vacas ao secar, tratamento dos casos clínicos, descarte de vacas com infecções crônicas, higiene, manejo e manutenção dos equipamentos de ordenha (PHILPOT & NICKERSON, 1991; NICKERSON et al., 1995; NICKERSON, 1998; MÜLLER, 1999; FONSECA & SANTOS, 2000).

Para fins de padronização nacional da qualidade do leite dentro de limites aceitáveis para o consumo humano, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com a aprovação da Instrução Normativa 51/2002 publicada em 20 de setembro de 2002 (IN-51), definiu novos parâmetros de qualidade para o leite cru resfriado, determinando que, a partir de julho de 2005, todo produtor que destina o leite para estabelecimento sob inspeção federal, deverá enviar as amostras ao laboratório oficial para a análise de sua composição (teores de gordura, proteína, sólidos totais), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). Dessa forma, ficou estabelecido que a análise de CBT no leite cru é exigida na produção de leite tipo “A” e “B”, sendo o limite de 10^4 a 5×10^5 Unidade Formadora de Colônias (UFC)/mL, respectivamente. Para o leite tipo “C”, não há limite para tal variável, até então, mas com a aprovação da IN-51/2002, foi estabelecido um limite máximo de CBT de 10^6 UFC/mL para o leite cru refrigerado.

Outro parâmetro definido para a qualidade do leite pela IN-51/2002 referiu-se sobre a Contagem Células Somáticas (CCS) em que foi adotado um limite máximo de 10^6 células/mL independente do tipo de leite cru produzido (A, B, C) (BRASIL, 2002). Apesar de o limite proposto para CBT ser muito superior ao limite internacional, que é de 10^5 UFC/mL, a obrigatoriedade desta análise é um grande avanço para o setor e irá proporcionar o conhecimento da qualidade do leite brasileiro (CASSOLI, 2005).

Para atender à demanda das análises do leite como determina a IN-51, o MAPA criou a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise de Qualidade do Leite (RBQL), por intermédio da Instrução Normativa 59/2002 (IN-59/2002) publicada em 04 de novembro de 2002, composta atualmente por sete laboratórios centralizados os quais possuem equipamentos automatizados de última geração e alto rendimento analítico.

2.4.1 Contagem Bacteriana

Em condições normais, o leite é estéril ao ser secretado pelos alvéolos do úbere, contudo, durante a ordenha, o leite pode se contaminar por um pequeno e bem definido número de organismos, provenientes dos canais lactíferos da cisterna da glândula e canal do teto (BRITO, 1999; FONSECA & SANTOS, 2000).

Quando o animal é sadio, esta contaminação varia de 5 a 20 UFC/mL sendo de pouca importância no aspecto quantitativo (PRATA, 2001). Entretanto, em condições inadequadas

de saúde da glândula mamária, do sistema de manejo e das condições de higiene adotadas na fazenda, esse número pode se elevar até vários milhares (SLAGHIUS, 1996; FONSECA & SANTOS, 2000; MURPHY & BOOR, 2000; EDMONSON, 2002).

2.4.2 Contagem de Células Somáticas (CCS)

Células somáticas são todas as células presentes no leite, que incluem aquelas originárias da corrente sanguínea e células de descamação do epitélio glandular secretor. Os leucócitos, em sua maioria, são mobilizados da corrente sanguínea para o tecido mamário diante de alterações na permeabilidade capilar (RIBAS, 1994).

Na secreção láctea de vacas com infecção intramamária, ocorre um aumento no número de células de defesa, passando a predominar neutrófilos seguidos por macrófagos, linfócitos e o número de células epiteliais permanecem inalterados (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

Com o aumento na CCS, a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos, são influenciados negativamente (KITCHEN, 1981), pois a extensão do aumento da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória, havendo uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite descritos por SCHÄELLIBAUM (2000).

Dentre os fatores que influenciam a CCS, podem-se citar além da idade da vaca, as estações do ano, estresse, estádios de lactação, entre outros. Os estádios de lactação estão associados a variações na CCS, em vacas livres de infecção na glândula mamária (SCHUTZ et al., 1990; LAEVENS, 1997), e esta influência pode ocorrer tanto no início quanto no final da lactação.

Entre os métodos laboratoriais recomendados para diagnosticar a incidência de mastite, principalmente subclínica nos rebanhos leiteiros, os mais usuais são a coadura do leite (caneca telada ou de fundo preto), Califórnia Mastitis Teste (CMT), Wisconsin Mastite Teste (WMT) (TORRES, 1985).

O Califórnia Mastitis Test (CMT) desenvolvido por SCHALM & NOORLANDER (1957), constitui-se num método indireto de avaliação da quantidade de células somáticas do leite, o qual se baseia na atuação de um detergente aniônico sobre a membrana celular, causando a ruptura da mesma e a formação de um gel na interação dos ácidos nucleicos com o detergente (ROSENBERGER 1983).

Segundo FAGLIARI (1983), o CMT constitui-se numa prova de triagem para detectar mastite subclínica de fácil execução, sendo indicado para monitorar rebanhos a campo onde observaram que amostras reagentes ao CMT nos graus 1+, 2+ e 3+ concordaram com o exame bacteriológico em 22,4%, 74,4% e 85,6% respectivamente.

2.5. Programas de controle de mastite

Os programas de controle de mastite visam diminuir a prevalência da doença a níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é viável. Entre as medidas recomendadas para o controle das mastites produzidas pela maioria dos microrganismos, incluem-se as medidas higiênicas. Esses procedimentos, entretanto, não são eficazes contra as infecções intramamárias (IIM) produzidas por microrganismos de origem ambiental ou oportunistas como *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae* ou coliformes. Encurtar a duração da IIM é um importante componente dos programas de controle de mastites, o que pode ser feito por meio de tratamentos das mastites subclínicas durante a lactação (SILVA et al., 1998).

CARNEIRO (2006), ao pesquisar a viabilidade técnica e o impacto econômico da erradicação de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos bovinos, concluiu que a estratégia da terapia de ataque parcial e do tratamento, no momento da secagem, associada à quarentena na entrada de animais no rebanho, à adoção de práticas adequadas na rotina de ordenha, como o monitoramento de CCS, ao controle microbiológico e ao comprometimento da equipe envolvida na execução do programa foram eficazes para erradicar e manter os rebanhos livres de mastite causada por *S. agalactiae*.

Tratamentos das mastites subclínicas, causadas principalmente por estafilococos e estreptococos, durante a lactação apresentam resultados variáveis quanto ao sucesso das terapias. Os índices de recuperação da glândula variam entre 3,6% e 92% (SOL et al., 1997).

Critérios bacteriológicos para avaliar o nível de cura das infecções da glândula mamária após tratamento com antimicrobianos foram propostos por WILSON et al. (1986) e SOL et al. (1997). Segundo WILSON et al. (1986) uma cultura bacteriológica negativa após 14 dias é suficiente para avaliar a recuperação da glândula, entretanto, SOL et al. (1997) sugerem duas culturas negativas entre os dias 14 e 30.

Esquemas terapêuticos utilizados para tratamento de mastites clínicas ou subclínicas recomendam entre uma e três aplicações medicamentosas, via intramamária, apresentando melhores resultados quando o número de aplicações é maior (BURAGOHAİN & DUTTA, 1990; TYLER et al., 1992; FRITCH et al., 1998), ou quando se faz uma terapia associada por via parenteral (OWENS et al., 1993, 1994).

No tratamento das mastites subclínicas devem ser levados em consideração o custo, o tempo de eliminação dos antibióticos e a perda de leite. Assim, são recomendados o menor número de aplicações visando à cura dos animais e o retorno rápido da produção normal do leite (WILSON et al., 1986; CULLOR, 1990).

2.6. LASER (Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation)

O termo LASER é um acrônimo que significa “Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada da Radiação”. Surgiu em 1961, no Hospital Presbiteriano de Nova York, que praticou, com êxito, a primeira intervenção cirúrgica empregando laser quando foi realizada a retirada de um pequeno tumor de retina que impedia a visão (CHAVANTES, 1990).

A cada dia, a utilização do laser vem sendo difundida e empregada em diversas áreas de conhecimento, como medicina (oftalmologia, dermatologia, cirurgia e outros), odontologia, biologia e fisioterapia por meio da prática clínica e do crescente número de trabalhos realizados comprovando seus efeitos e sua eficácia. O laser já faz parte da vida moderna, sob muitas formas, sendo considerado na ciência, na tecnologia e na medicina um dos maiores avanços do século. Na área da saúde, é a sua condição menos invasiva que o torna um instrumento imprescindível no campo terapêutico da era moderna (CHAVANTES & JATENE, 1990).

Os raios laser são instrumentos capazes de levar energia aos tecidos biológicos com grande precisão, sendo uma forma de radiação óptica não ionizante altamente concentrada. Quando em contato com os diferentes tecidos, de acordo com o comprimento de onda de cada laser, resultam efeitos diversos como fototérmico, fotoquímico, fotomecânico e fotoelétrico (CHAVANTES, 1990).

2.6.1 Características do Laser

NICOLA (1994) relatou que as características que diferenciam a luz laser das outras fontes luminosas são: monocromaticidade, coerência e colimação. A qualidade monocromática implica que a luz emitida apresenta somente um ou uma estreita faixa de

comprimento de onda, ao contrário das fontes de luz convencionais. A maioria dos raios laser apresentam feixes colimados, isto é, com um mínimo ângulo de divergência, e coerência significa que as ondas de luz estão em fase, sendo uma característica única do laser e, devido a esta, o laser pode eficientemente ser focado em fibras ópticas, o que permite acesso às cavidades internas do corpo, guiando a fibra através de endoscópios, ou iluminação intersticial, quando a fibra é inserida no interior do tecido, através do lúmen de uma agulha.

Os parâmetros dosimétricos do laser foram descritos por JACQUES (1995) como:

- *Comprimento de onda (λ)*

Determina a profundidade de penetração da luz no tecido irradiado, pois para um mesmo tecido, tem-se a possibilidade de que com diferentes comprimentos de ondas, obtêm-se diferentes coeficientes de absorção.

- *Frequência (f)*

Refere-se ao número de ciclos num determinado período de tempo, sua unidade de medida é o Hertz (Hz).

- *Amplitude (A)*

Fornece a magnitude de vibração sendo que esta é definida como a altura da crista da onda.

- *Potência (P)*

Indica a potência de saída do aparelho ao alcançar o tecido, é medido em Watts (W).

- *Energia (E)*

Corresponde à potência aplicada em um determinado período de tempo (T), sendo expressa em Joules (J), obtida pela equação $E=P \times T$.

- *Densidade de Potência (DP) ou Irradiância*

Definida como a potência óptica de saída do Laser em Watts, dividida pela área (A) irradiada em cm^2 , obtida pela equação $DP=P/A= \text{W}/\text{cm}^2$.

- *Densidade de Energia (DE) ou Fluência*

Obtida através da energia total (E) sobre uma determinada área (A), $DE=E/A=\text{J}/\text{cm}^2$.

2.6.2. Interação Laser com o Tecido Biológico

A interação do laser com os tecidos vivos é representada por fenômenos complexos, influenciados pelos parâmetros do laser e por propriedades do tecido. Os parâmetros essenciais da radiação laser, que determinam sua interação com a matéria são o comprimento de onda, a densidade de potência e a densidade de energia entregues a este tecido. Os fatores biológicos que influenciam a interação laser-tecido são mais amplos, tais como: tipo de célula, perfusão sanguínea, condução térmica, entre outras. As propriedades ópticas dos elementos teciduais determinam a natureza e a extensão dos processos de reflexão, transmissão, absorção e espalhamento. Outros fatores envolvidos são os vários processos mecânicos e fisiológicos que ocorrem como um resultado da transformação da energia no tecido. Estes incluem: condução de calor e dissipação, resposta inflamatória a estímulos nocivos, alteração da vascularização tecidual e mecanismos de reparação (JACQUES, 1995).

BRUGNERA & PINHEIRO (1999) em seu trabalho descreveram que a radiação pode interagir com o tecido biológico de quatro maneiras diferentes. Primeiro, parte da radiação incidente pode ser refletida sem penetrar no tecido ou interagir com ele. Segundo, uma parte pode ser transmitida pelo tecido sem sofrer atenuação, como se ele, o tecido, fosse transparente ao feixe incidente. Terceiro, uma parte pode ser absorvida pelos diferentes componentes teciduais – neste caso haverá transferência de energia da radiação para o tecido. Quarto, a radiação que não sofreu esses processos pode penetrar no tecido e ser espalhada sem produzir qualquer efeito notável sobre o mesmo. Na maioria dos casos, a extensão da interação laser-tecido, será proporcional à quantidade de radiação absorvida pelo tecido para um comprimento de onda particular.

Os elementos teciduais que apresentam um alto coeficiente de absorção para um comprimento de onda particular ou para um espectro de energia são denominados de cromóforos. Os principais cromóforos em tecidos biológicos são: hemoglobina, melanina e a água. Assim, os diferentes tipos de laser apresentam efeitos específicos nos tecidos, sendo que estas variações se devem aos diferentes comprimentos de onda e dos próprios tecidos, constituídos basicamente de água, além do comprimento de onda (λ) que determina a sua absorção (BUSANELLO, 2003).

2.6.3 Classificação dos Lasers, segundo seus efeitos

CHAVANTES (1990) classificou os raios laser de acordo com os seus efeitos dividindo-os em dois grupos: Laser de Alta Potência ou Laser Cirúrgico e Laser de Baixa Potência ou Laser Terapêutico.

O laser de Alta Potência é caracterizado por apresentar potência superior a um Watts, com a possibilidade de obterem-se vários eventos no tecido biológico dependendo do seu coeficiente de absorção, como os efeitos: fototérmico, fotomecânico e fotoablativo (CHAVANTE et al., 1990). Este tipo de laser é muito utilizado em procedimentos cirúrgicos na medicina, ocorrendo o efeito fototérmico pela desnaturação das proteínas quando submetido à temperatura de até 60°C, coagulação com temperaturas entre 65 a 80°C, a carbonização com temperatura de 100°C, vaporização com temperatura de 400°C e disrupção com temperatura de até 20.000°C (CHAVANTE & JATENE, 1990).

BRUGNERA & PINHEIRO (1999) ao descreverem o efeito fotomecânico relatam que este ocorre pelas interações fotodissociação e fotoplasmólise, sendo o resultado da remoção teciduais pela formação de íons e partículas carregadas eletricamente. O efeito fotoablativo é a manifestação clínica do efeito de fotodisrupção, também conhecida como efeito ionizante, quando aplicado em tempo muitíssimo curto, causando a quebra estrutural das ligações quaternárias da célula. O processo se caracteriza pela remoção do tecido por formação de plasma e rompimento do tecido alvo.

O autor ainda relata que o laser de Dióxido de Carbono (CO₂) é do tipo de alta potência onde o meio ativo é uma mistura de CO₂, Nitrogênio e Hélio, com comprimento de onda de 10600 nm, sendo fortemente absorvido pela água com mínimo grau de espalhamento. Sua absorção é tão eficiente que causa uma produção de calor rápida e localizada, resultando em uma vaporização da água celular e uma abrasão do tecido.

CHAVANTES (1998) constatou que o laser Nd:YAG também é do tipo de alta potência com meio ativo de cristal de ítrio-alumínio, operando com comprimento de onda 1064 nm. Já nesse tipo de laser, a água intracelular não permite boa absorção, porém, a penetração e a profundidade são maiores se comparadas ao laser de CO₂.

Em relação ao Laser de Baixa Potência (LBP ou LED), RIGAU (1996) descreveu que é todo laser com potência inferior a um Watts e que não provoca aumento de temperatura no

tecido alvo, não ultrapassando a 0,5°C, ocasionando efeitos não térmicos, mas ocorrendo os efeitos fotoquímicos e fotofísicos.

O autor ainda descreve que o princípio básico do processo fotoquímico é que comprimentos de onda específicos da radiação são absorvidos por cromóforos naturais que são capazes de estimular certas reações bioquímicas em nível celular (bioestimulação). Derivados de cromóforos naturais ou corantes podem ser utilizados como fotossensibilizantes para induzir reações biológicas com aplicações diagnósticas (fluorescência) e terapêuticas (terapia fotodinâmica).

A radiação visível (400-700 nm) induz efeito fotoquímico, ou seja, há uma ativação direta da indução de sínteses de enzimas, tendo como primeiros alvos os lisossomos e as mitocôndrias das células (KARU et al., 1995). KARU (1999) sugere que a absorção da luz é realizada pelos componentes (fotorreceptores) da cadeia respiratória, tais como as flavinas e citocromos, resultando em uma aceleração da transferência de elétrons em partes da cadeia respiratória, ocorrendo à produção de ATP. A absorção de fótons por essas biomoléculas intracelulares produz estimulação ou inibição das atividades enzimáticas e de reações químicas.

2.7.Terapia Fotodinâmica (PDT)

A Terapia Fotodinâmica (PDT) teve origem no início do século XX, em Munich, quando Oscar Raab, um estudante de medicina, orientado pelo professor Herman Von Tappeiner, observou os efeitos decorrentes de fotossensibilização em paramécio da malária. O interesse principal era o de identificar o processo por meio do qual a droga quinina era eficaz contra malária enquanto outros agentes como a acridina, derivado de coaltar, eram tóxicos contra protozoários *in vitro* e não *in vivo*. Porém, Raab, que conduzia o experimento observou que o paramécio morria entre 60 a 100 minutos após a adição de acridina na concentração de 1/20000 ao meio. Em outro experimento, o paramécio sobreviveu por 800 a 1000 minutos com a mesma concentração da droga. Relatou o autor que a única diferença entre a realização dos dois estudos foi a ocorrência de uma tempestade, acarretando condições adversas de luminosidade ambiente. Assim, os pesquisadores passaram a indagar se a luz possuía influência nos resultados (TAPPEINER & JESIONCK, 1903).

Em 1907, Von Tappeiner coletou os dados de todos os experimentos descritos e os publicou em um livro utilizando, pela primeira vez, o termo Terapia Fotodinâmica, que foi definido como “o processo de fotossensibilização dependente de oxigênio” (DANIEL & HILL, 1991).

As pesquisas com terapia fotodinâmica tiveram grande avanço nos últimos 20 anos tendo demonstrado alta eficácia em estudos experimentais em animais e aplicações clínicas, principalmente em tratamentos de neoplasias que não respondem a terapia convencional (HAYATA, 1988).

A Terapia Fotodinâmica (PDT) consiste na administração local ou sistêmica de uma substância inerte, que pode ser um pigmento ou uma droga, porém que tenha um efeito citotóxico quando fotoativado em um determinado comprimento de onda. Dessa forma, obtém-se um efeito fotoquímico, que consiste na estimulação dos cromóforos presentes nos pigmentos que foram anteriormente absorvidos pela célula, pela da energia transmitida por fótons de uma fonte luminosa. Assim, devido à absorção de energia, os cromóforos passam de um estado basal a um nível excitado (DUARTE, 2002).

2.7.1. Fotossensibilizantes (FS)

Um fotossensibilizante é geralmente definido como uma substância que induz sensibilidade luminosa a processos químicos e físicos, normalmente insensíveis à luz (STERNBERG et al., 1998).

É importante que o composto fotossensibilizante apresente absorção de luz em um determinado comprimento de onda, cujo tecido biológico normal adjacente seja relativamente transparente. Além disso, o FS deve apresentar uma banda de absorção bastante estreita, com baixa absorção para outros comprimentos de onda do espectro solar, diminuindo assim os efeitos locais causados pela fotossensibilidade cutânea (STERNBERG et al., 1998).

CASTANO et al. (2004) descreveram que o fotossensibilizante ideal deve apresentar baixo nível de toxicidade quando não expostos à luz, tanto em humanos como em animal de experimento, baixa incidência de toxicidade administrativa, ou seja, sem reações alérgicas ou de hipotensão, devem absorver luz vermelha para a penetração no tecido, pois a absorção em comprimento de ondas curtas tem menos penetração nos tecidos e são mais susceptíveis a conduzir fotossensibilidade cutânea; a absorção em comprimento de onda muito alta, os fótons não terão energia suficiente para as alterações fotoquímicas. Assim, devem ter elevada absorção no comprimento de onda específico para minimizar a dose do fotossensibilizante necessário para alcançar o efeito desejado.

Sua síntese deverá ser relativamente fácil com matérias-primas disponíveis para fazer em produção com grande escala e viável, sendo um composto puro com composição constante e prazo de validade estável, hidrossolúvel ou solúvel em mistura aquosa não tóxica. Deve-se não agregar indevidamente porque em ambientes biológicos reduz a eficiência fotoquímica. A eliminação no organismo do doente deverá ser rápida, com menos de um dia para evitar a necessidade pós-tratamento para proteção da exposição da luz e fotossensibilidade cutânea prolongada (CASTANO et al., 2004).

GARCEZ et al. (2003), relataram que os FS mais utilizados são: derivados da hematoporfirina, fenotiazinas (azul de metileno e azul de toluidina), cianinas e fitoterápicos. Na Tabela 1 estão relatados os principais agentes fotossensibilizantes utilizados em PDT, segundo aqueles autores.

Tabela 1: Principais agentes fotossensibilizadores (FS), corantes, suas respectivas bandas de absorção.

Substâncias Fotossensibilizadores	Banda de absorção
Derivados da hematoporfirina	620-650 nm
Fenotiazinas (azul de metileno e azul de toluidina)	620-700 nm
Cianinas (indocianina verde)	600-805 nm
Fitoterápicos (azuleno)	550-700 nm
Ftalocianinas	660-700 nm

Fonte: GARCEZ et al. 2003.

Um ponto crucial no PDT é o balanço entre a distribuição da droga e o tempo de espera para o início da irradiação, de tal modo que a concentração do fotossensibilizante no tecido doente esteja adequada (STERNBERG et al., 1998).

ZHUANG (1999) relatou que o comprimento de onda ideal depende do cromóforo alvo utilizado nos tratamentos. No entanto, as densidades de energia entre 100 e 200 J/cm² são utilizados na maioria dos trabalhos com PDT, mas que densidades de energia superiores a 200 J/cm² podem causar fotodegradação da molécula do corante.

2.7.2. Mecanismos do PDT

No PDT, os fotossensibilizantes (FS) são administrados de forma sistêmica ou tópica. Após um determinado tempo, quando o FS atingiu uma concentração máxima no tecido, a região de interesse é irradiada com luz de comprimento de onda específico para excitar o FS. Ao absorver esta radiação, estando em um estado excitado, a molécula do fotossensibilizante sofre decaimentos sequenciais ou simultâneos, resultando em reações de transferência de energia intramolecular. Os principais tipos de reações são a foto-oxidação por radicais (reação tipo I), a foto-oxidação envolvendo oxigênio singlete (reação tipo II), e a fotoreação não envolvendo oxigênio (reação tipo III). Estes processos podem ocorrer simultaneamente ou em competição (SIBATA, 2000).

A maioria das reações é do tipo I, e elas envolvem a transferência de um átomo de hidrogênio ou de um elétron entre fotossensibilizador e alguma outra molécula. Este processo é mais propenso pelo aumento de complexos não covalentes entre o pigmento e as moléculas aceptoras formadas antes da iluminação. As maiorias dos radicais produzidos nessas reações interagem com o oxigênio molecular, gerando espécies ativas de oxigênio como, por exemplo, OH, HO₂, O₂ e H₂O₂. Já o processo tipo II, envolve a transferência de energia entre o fotossensibilizador e o oxigênio. Como resultado deste segundo processo, obtém-se o corante no estado fundamental e o oxigênio em seu estado excitado mais baixo. Estas reações ocorrem mais facilmente em meio hidrofóbico (SIBATA, 2000).

As reações do tipo I são favorecidas por altas concentrações de substrato e baixa concentração de oxigênio, enquanto as reações do tipo II são favorecidas por uma situação contrária, ou seja, baixa concentração de substrato e alta concentração de oxigênio. Existem as reações do tipo III que não envolvem oxigênio. É importante observar que o mecanismo de ação pode trocar do tipo I para o tipo II devido a mudanças da oxigenação do tecido durante o PDT (SIBATA, 2000).

2.7.3. Utilização do PDT nos microorganismos

A resistência bacteriana frente à antibioticoterapia está conduzindo cada vez mais a elaboração de terapias antimicrobianas de interesse mundial (WISE et al, 1998). Na Odontologia, os lasers e LEDs estão sendo utilizados principalmente como auxiliares na redução bacteriana (GARCEZ et al. 2003; ZANIN et al. 2005).

No entanto, os LEDs, quando associados a corantes, podem levar à morte ou redução dos microorganismos, sem causar danos ao organismo, processo conhecido como fotossensibilização letal ou terapia fotodinâmica (PDT). Há alguns anos, essa terapia foi adaptada para a utilização em bactérias e o princípio da fotossensibilização letal é igual ao do PDT, utilizada para o tratamento de tumores (BEVILACQUA et al., 2006).

A terapia fotodinâmica teria duas grandes vantagens sobre antissépticos e antimicrobianos convencionais: primeiro, como nenhum dos dois componentes do sistema (luz e fotossensibilizante) é inerentemente bactericida, o efeito antimicrobiano seria limitado para regiões luz-irradiadas em áreas fotossensibilizante-tratadas, evitando um desequilíbrio na microflora local, com exceção daqueles que estão sendo alvejados; segundo, e talvez mais importante, o desenvolvimento de resistência para fotoquímica induzindo à morte a qual é mediada predominantemente por oxigênio singlete que seria improvável (WAINWRIGHT, 1998).

A cinética e a localização do fotossensibilizante dependem de parâmetros como lipofilicidade e carga elétrica (aniônico ou catiônico), se a entrada na célula ocorre por difusão ou endocitose (OLEINICK & EVANS, 1998). Assim, DEMIDOVA & HAMBLIN (2004) relataram que a utilização de FS catiônico aumenta a permeabilidade da membrana externa (bicamada lipídica) permitindo a eliminação dos microrganismos Gram negativos, já que esta

eliminação ocorre porque a permeabilidade bacteriana é carregada negativamente formando uma barreira natural.

Essa eficácia da morte bacteriana promovida pelos FS utilizados no PDT tem sido confirmada como sendo significativamente diferente entre as bactérias gram positivas e gram negativas, com maior eficácia contra as bactérias gram positivas, pois as bactérias gram negativas apresentam a membrana externa (bicamada lipídica) fora da camada de peptídeoglicano (MERCHAT et al. 2001).

HAMBLIN et al. (2002) sugeriram em seu trabalho que há evidências que os FS, que penetram no interior da bactéria, podem ser mais efetivos que aqueles que agem na superfície bacteriana, isto não quer dizer que os FS, que agem na superfície bacteriana, não sejam eficazes como relatado nos trabalhos de BHATTI et al. (1998).

SOUKOS et al. (1996) observaram, em sua pesquisa, que a maioria do microrganismos é sensível à terapia com luz vermelha depois de fotossensibilizados com os fenotiazinas. Esse efeito é dependente de alguns parâmetros, tais como: comprimento de onda, densidade de potência, densidade de energia e concentração do fotossensibilizante, para se obter o efeito bactericida desejado.

SOUKOS et al. (1998), ao estudarem o efeito do PDT contra *Staphylococcus aureus*, observaram que o efeito deletérico pode possuir uma variação considerável quando o FS usado, estabelecendo que, para organismos gram-positivos, tanto FS carregados positivamente como carregados negativamente são efetivos para mediar o PDT.

BURNS (1992) reportou em sua pesquisa, que quando aplicou a irradiação laser de baixa potência de HeNe e diodo de arsenieto de gálio, ambos operando com a mesma potência de 8mW e sensibilizados pelos corantes, azul de toluidina, fitalocianina disulfonato alumínio, em concentrações idênticas 0,005% dos corantes, em 60 segundos de exposição de irradiação, concluíram que os dois laser e as duas irradiações com os corantes apropriados foram efetivos na eliminação de bactérias cariogênicas estudadas, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum*.

As pesquisas desenvolvidas por SANKAR (1987), utilizando o laser de HeNe com potência de 7.3mW por 30 segundos, na presença de 50µg de azul de toluidina como FS, avaliaram grupos de bactérias, antes e depois da irradiação, e obtiveram bons resultados em bactérias sensibilizadas, 91,1% em bactérias aeróbias e 96,6% em bactérias anaeróbias.

MÜLLER et al. (2006) avaliaram em seu trabalho a ação antimicrobiana do PDT no combate ao *Staphylococcus aureus* em um estudo comparativo entre os fotossensibilizantes. Utilizaram o LED arsenieto de gálio alumínio (As-Ga-Al), operando em 685nm, com potência de 30 mW, densidade de energia de 4,5J/cm² por 5 minutos de irradiação, utilizando azul de metileno na concentração de 0,01% e alumínio fitalocianina tetrassulfonada na concentração de 35µM. Os autores concluíram que o PDT tem boa funcionalidade como alternativa para uma terapia antibiótica tópica, mas somente uma experimentação clínica controlada e minuciosa poderia provar a eficácia para inativação de bactérias *in vivo*. Já que foi observada uma atividade antimicrobiana quando utilizado apenas o FS estudado *in vitro*.

SOUKOS et al. (1998) usaram, em suas investigações, uma luz policromática em combinação com FS como as hematoporfirinas, desenvolvidas para uso em terapia fotodinâmica para tratamento de tumores, e observaram que os corantes como o azul de toluidina poderiam causar efeito deletérico, em bactérias estudadas *in vitro*.

2.8.LASER e Mastites

Ao estudarem os efeitos anti-inflamatórios do laser em processos agudos, SKOBELKIN et al. (1984) avaliaram o uso do laser de CO₂ ,no tratamento da mastite aguda

purulenta em mulheres em aleitamento, e observaram que houve uma melhora com a redução na duração do tratamento.

ALEKSEENKO et al.(1987), analisaram o tratamento de mastite aguda supurada em mulheres, utilizando a radiação a laser e campo elétrico de corrente contínua nas feridas na glândula mamária, verificaram que essa abordagem é justificada pela patogenicidade ocorrendo um aumento na eficiência do tratamento neste tipo de mastite.

SKOBELKIN et al. (1988) confirmaram a eficiência do laser de CO₂, no tratamento de 104 mulheres, no aleitamento com mastite aguda, e concluíram que a técnica do laser diminuiu o período de tratamento dos pacientes em 1,5 a 2 vezes mais curto em comparação com um grupo controle, e a incidência de recidivas foi de 3,8 vezes menos frequentes.

STOFFEL et al. (1989) estudaram os efeitos da radiação de LBP de HeNe na glândula mamária bovina para determinar um protocolo de tratamento de mulheres em aleitamento, a glândula mamária bovina foi escolhida pela sua especial aptidão para a avaliação das mudanças inflamatórias e pela sua recuperação rápida.

Os autores descreveram que aplicaram a irradiação de 25 mW em uma área de 7,5 cm de diâmetro no quarto dianteiro direito da glândula mamária, por um período de 30 minutos, diariamente, durante cinco dias consecutivos. Dos animais do experimento, seis vacas foram utilizadas como controle para avaliar os efeitos desse tratamento sobre a glândula mamária saudável, 12 vacas foram induzidas a terem mastite subclínica, e quatro casos de mastite subclínica espontâneos foram tratados com a mesma metodologia. Em ambas as experiências o quarto mamário traseiro esquerdo serviu como controle, alguns parâmetros foram medidos incluindo produção de leite, contagem de células somáticas, condutividade, Na/K no soro do leite, concentrações de gordura, proteína e lactose no leite. Os autores relataram que não houve evidências de qualquer estimulação da glândula mamária saudável ou efeitos terapêuticos sobre a mastite subclínica com a utilização de LBP de HeNe, assim como não houve alterações nos parâmetros avaliados no leite, mas somente aqueles decorrentes da mastite subclínica.

DOTSENKO et al. (1989), ao verificar a utilização do laser CO₂ no tratamento de mastite aguda durante a lactação em 155 mulheres com feridas purulentas supuradas na glândula mamária, observaram que 94,3% das mulheres tratadas com o laser de CO₂ ficaram menos tempo hospitalizadas.

KOVALEV (1990) em seu estudo de prevenção e tratamento de mastite em mulheres utilizando radiação de LBP, tratou 329 mulheres em risco de mastite com fissura de mamilo e 68 mulheres com pós-parto normal. O autor concluiu que houve redução na incidência do risco de mastite no grupo tratado em cinco vezes (de 18,6% para 3,7%), valores próximos de um puerpério normal, descrevendo ainda que o aparelho de laser com comprimento de onda 630 nm apresentou uma maior eficácia terapêutica e preventiva em comparação com o aparelho com comprimento de onda 890 nm.

CHERKASSKAIA et al. (1994) realizaram um estudo de comparação entre tratamentos em pacientes cirúrgicos com feridas supuradas em tecidos moles tratados com laser infravermelho pulsado e contínuo com os métodos tradicionais (antibióticos, antissépticos, pomadas) conduzido sob condições clínicas. Abscessos e mastite foram estudados antes e após a operação sobre o 3º, 6º, e 12º dia no pós-operatório. Os autores verificaram que *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico da infecção purulenta, em 75,2% dos casos. O efeito bactericida da radiação infravermelha de pulso e contínuo levaram a uma diminuição do número de pacientes infectados sendo mais rápida a limpeza das feridas. Com o laser contínuo o tratamento foi completamente encerrado no sexto dia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo constou do tratamento de mastite subclínica por meio do uso de Terapia Fotodinâmica (PDT), que consiste na aplicação do agente fotossensibilizante mais a irradiação por Laser no quarto mamário infectado.

O experimento foi realizado em animais de uma fazenda localizada em Caçapava, município do interior do estado de São Paulo, no Vale do Paraíba paulista, região onde predomina a bovinocultura leiteira. A propriedade compunha uma área de 150 hectares, distribuídos em pasto, capineira, curral, área administrativa e moradia de colonos. A alimentação dos animais consistia em silagem, cevada, poupa cítrica, caroço de algodão, concentrado e pasto. Os animais eram identificados com brincos nas orelhas, separados por lotes e todos ficavam confinados em piquetes formados por *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*. O rebanho era composto por fêmeas da raça holandesa preta x branco e girolandas, com a finalidade comercial na produção de leite do tipo B refrigerado. O leite produzido era recolhido a cada 24h em caminhões com tanque apropriado e levados a COOPER, Cooperativa de Laticínios de São José dos Campos Ltda., onde era processado para a comercialização.

3.1 Seleção dos animais

O rebanho leiteiro era composto por 197 animais sendo 164 fêmeas em diferentes fases da lactação. O intervalo entre partos (IEP) era de 14 meses com taxa de concepção de 1,94 doses/prenhes. Todas as vacas que estavam em lactação no período de abril a outubro de 2007 foram selecionadas e inspecionadas para identificação da presença de mastite subclínica.

A ocorrência de mastite subclínica foi pesquisada pelo Califórnia Mastitis Test (CMT), realizado uma vez por semana, na primeira ordenha do dia, sendo este exame realizado em todas as vacas em lactação antes da ordenha, para selecionar os animais que apresentavam reação positiva ao CMT.

As fêmeas em lactação que apresentaram positividade de três cruces (+++) em quatro exames seguidos do CMT foram, então, selecionadas para o experimento. As fêmeas selecionadas encontravam-se em período de lactação de 1 a 12 meses.

3.2 Ordenha

Inicialmente o sistema de ordenha era do tipo mecânica com balde ao pé (Figura 1), sendo posteriormente estruturada para o tipo mecânica em espinha de peixe 2x6 (Figura 2), realizada duas vezes ao dia. A primeira às 04h e a segunda às 15h, sendo as vacas ordenhadas na seguinte sequência: primeiro vacas primíparas e vacas isentas de mastite clínica, a seguir, vacas que tiveram mastite clínica recentemente e, por último, vacas com problemas de mastite ou em tratamento cujo leite era separado do restante. Durante a ordenha eram adotados os seguintes procedimentos:

- a) realização do teste da caneca de fundo preto e se fosse detectado a presença de grumos o animal era ordenhado posteriormente e o leite desprezado;
- b) higienização do úbere;
- c) imersão dos tetos em solução clorada na proporção de 1:1;
- d) secagem dos tetos com papel toalha descartável.

Ao término da ordenha desinfetavam-se os tetos por imersão em solução de iodo. Após este procedimento, oferecia o alimento no cocho para cada lote, por um tempo mínimo de 30 minutos, tempo suficiente para o fechamento do esfíncter do canal do teto.



Figura 1: Ordenha com balde ao pé, em um primeiro instante, na fazenda.



Figura 2: Ordenha em espinha de peixe (2x6), no segundo momento.

3.3 Equipamentos de Laser

Foram testados dois tipos de aparelhos de emissão de Laser de Baixa Potência (LED) de luz vermelha, operando no comprimento de onda de 630 nm. O primeiro aparelho da marca MMOptics® com nome comercial FISIOLED® (Figura 3), era composto de gabinete e caneta que atingia a potência de 80 mW na saída. O segundo aparelho da marca MICRODONT®, com nome comercial de STARLASER® (Figura 4), composto apenas de caneta que compõe o gabinete e o emissor, atingindo a potência de 400 mW em sua saída.



Figura 3: Aparelho de laser FISIOLED® da MMOptics® com ponteira de acrílico adaptada.



Figura 4: Aparelho de laser STARLASER® da Microdont® com ponteira de acrílico adaptada.

Para guiar a emissão da luz pelo orifício do teto até atingir o local desejado para o tratamento, os aparelhos foram adaptados com ponteira de acrílico construídos na Oficina Óptica da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), medindo 100 mm de comprimento por 5 mm de diâmetros (figura 5 e 6), o que permitiu a introdução da ponteira até próximo ao parênquima glandular, para que a irradiação atingisse toda a parte glandular do teto quando infectado.

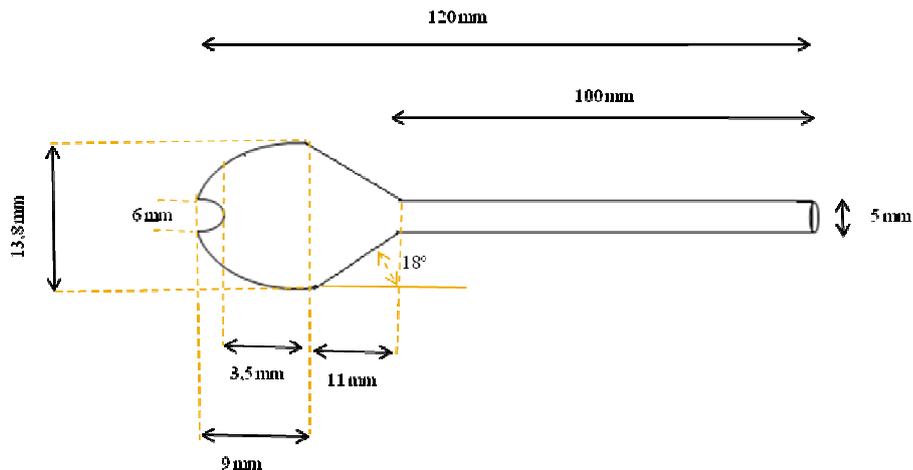


Figura 5: Desenho esquemático da ponteira de acrílico.



Figura 6: Fabricação da ponteira de acrílico na oficina Óptica da UNIVAP.

Em seguida, foram realizadas várias aferições nos dois aparelhos do laboratório para determinar a intensidade da irradiação laser para o protocolo de procedimentos na execução do trabalho proposto.

3.4. Parte I – Pilotos Experimentais

3.4.1. Experimentos para testar as ponteiros de acrílico adaptadas

3.4.1.1. Comparação dos dois aparelhos (experimento *in vitro*)

A aferição e comparação dos aparelhos com as ponteiros de acrílico adaptadas foram realizadas no Laboratório de Óptica Biomédica da UNIVAP. Este teste foi elaborado ao ligar o aparelho e após 60 segundos, observando-se possíveis oscilações de potência na emissão da luz. Continuando a aferição observou-se a emissão da luz a cada centímetro em toda a extensão da ponteira. Este procedimento foi repetido girando-se a ponteira de acrílico a 180°, conferindo a emissão de luz para uma possível irregularidade na superfície do lado oposto.

Após esses procedimentos, outras aferições foram realizadas, desta vez, em provetas de 50 mL, vazias, contendo leite e com uma mistura de leite mais o agente fotossensibilizante, azul de toluidina a 2,5%, nas seguintes proporções: 50 mL/1 mL; 100 mL/1 mL e 200 mL/1 mL. Foi introduzida a ponteira de acrílico dentro da proveta em três profundidades, no marco zero, cinco e 10 cm de profundidade semelhante à penetração no teto, simulando até o local onde a ponteira atingiria o interior do teto do animal quando fosse tratado.

Para observar a dispersão da luz na solução leite mais o azul de toluidina a 2,5% contido na proveta, foi realizada uma aferição encostando-se o medidor de intensidade de potência de raio na lateral da proveta contendo a solução de maior diluição.

O leite utilizado para aferições foi oriundo das vacas com mastite subclínica, sendo necessário dimensionar a quantidade de leite residual após a ordenha, para se calcular a concentração ideal do agente fotossensibilizante desencadeante da reação desejada quando utilizar o PDT. Escolheram-se, ao acaso, seis vacas com mastite subclínica, estando em diferentes períodos de lactação. Após a ordenha, o teto afetado foi esgotado manualmente e com este leite foi dimensionado o volume residual. Dos seis animais esgotados obteve-se um volume médio de 145 mL de leite residual o qual foi utilizado no experimento com diferentes proporções do azul de toluidina a 2,5%.

3.4.1.2 Experimento em peça fresca de matadouro

Em seguida, foi testada a ponteira de acrílico para se certificar de que a mesma passaria ou não pelo esfíncter do teto, chegando à cisterna da glândula e próximo ao parênquima glandular. Para isso, coletou-se um úbere fresco no matadouro que foi levado para o Laboratório Óptico Biomédica. Lá, foram adotados os seguintes procedimentos:

- a) Inspeção do estado geral da glândula mamária e numeração os tetos de 1 a 4 (figura 7);
- b) Realização do exame de CMT nos tetos anteriores direito e esquerdo e posteriores direito e esquerdo, onde observaram-se as seguintes anormalidades: um teto afuncional, um teto com mastite clínica e dois tetos com mastite subclínica;
- c) Utilizou-se o Azul de Metileno a 1% como agente fotossensibilizante, substância pertencente ao grupo das fenotiazina com banda de absorção de 620 a 700 nm, injetando-se 1,0 mL desta solução no interior do teto até chegar à cisterna da glândula, usando para isso uma sonda uretral de nº 08. Após a aplicação massagearam-se os quartos para que o agente fotossensibilizante fosse espalhado de forma mais homogênea (figura 8).
- d) Foram testadas quatro densidades de energia diferentes com irradiação de $25\text{J}/\text{cm}^2$, $50\text{J}/\text{cm}^2$, $75\text{J}/\text{cm}^2$ e $100\text{J}/\text{cm}^2$, sendo uma dose para cada teto. Com o cálculo da densidade de energia determinaram-se os tempos de exposição da irradiação. Assim, o teto 1 foi irradiado com $25\text{J}/\text{cm}^2$ que corresponde a 104 segundos de exposição, teto 2 foi irradiado com $50\text{J}/\text{cm}^2$ que corresponde a 209 segundos de exposição, teto 3 foi irradiado com $75\text{J}/\text{cm}^2$ que corresponde a 314 segundos e o teto 4 foi irradiado com $100\text{J}/\text{cm}^2$ que corresponde a 418 segundos, em cada nível. O aparelho utilizado foi o MMOptics®, e cada teto recebeu dois níveis de irradiação. No primeiro nível, fez-se uma compressão do teto tentando atingir a área mais próxima do parênquima glandular e o segundo nível na ponta dos tetos relaxados.
- e) Após a irradiação os quatro tetos, (figura 9), foram abertos para a inspeção visual quando se coletou fragmentos da cisterna da glândula que foram fixados em solução de formol a 2%, com as identificações das respectivas dosagens de energia e enviados ao Departamento de Histologia da UNESP de São José dos Campos para a realização do exame histológico (Figura 10).



Figura 7: Inspeção e numeração dos quartos mamários.



Figura 8: Introdução do azul de metileno a 1% por sonda uretral.



Figura 9: Aplicação do laser MMOptics® com o teto relaxado.



Figura 10: Colheita de amostra de material para a histologia.

3.4.2 Experimentos para Determinar a Densidade de Energia (DE)

3.4.2.1 Experimento *In Vivo*, para tratamento de mastite subclínica, através do PDT com o intervalo de 48h entre as aplicações

Após selecionar as vacas com mastite subclínica através do CMT, foi escolhido apenas um teto infectado de cada animal para este experimento, sendo que estes animais encontravam-se no período de lactação entre 6,7 meses em média. Então oito animais com mastite subclínica e quatro animais sadios foram selecionados (12 tetos), agrupados em cinco lotes de acordo com a densidade de energia a ser testada. O grupo 1 foi proposto a densidade de energia de $25\text{J}/\text{cm}^2$ (104s), o grupo 2 foi proposto a densidade de energia de $50\text{J}/\text{cm}^2$ (209s), o grupo 3 foi proposto a densidade de energia de $75\text{J}/\text{cm}^2$ (314s), o grupo 4 foi proposto a densidade de energia de $100\text{J}/\text{cm}^2$ (418s) e o grupo 5 foi usado como controle sem irradiação e sem mastite subclínica composto de 4 tetos. O aparelho utilizado foi MMOptics® e foram utilizados os mesmos tempos de exposição à irradiação quando aplicado em peça fresca de matadouro. O agente fotossensibilizante escolhido foi o azul de toluidina a 2,5% pela letalidade contra bactérias, descrita na literatura. Assim, 1 mL da solução foi injetado por uma sonda uretral de nº 8 que foi introduzida pelo esfíncter do teto até chegar à cisterna da glândula (figura 11).

As vacas selecionadas eram colocadas na sala de ordenha e após a higienização do úbere fazia-se o exame de CMT, em seguida, limpava-se o teto selecionado com álcool a 70% e coletavam-se amostras de leite em frascos estéreis identificados os quais eram armazenados em caixas isotérmicas com gelo reciclável e enviados a dois laboratórios. No Laboratório Quaglia foram elaborados os exames microbiológicos (isolamento e caracterização) e no Laboratório Clínica do Leite foi realizada a Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS), ambos por citometria de fluxo.

Após a coleta do leite para exames, executava-se a ordenha normalmente; após a ordenha os animais permaneciam presos na sala de ordenha para início do tratamento específico. Para isso, limpava-se novamente o teto selecionado com álcool a 70% e introduzia-se a sonda uretral no canal do teto e injetava-se a solução de azul de toluidina a 2,5%. Em seguida, retirava-se a sonda, massageava-se o teto, para que o agente fotossensibilizante se misturasse ao leite residual. Em seguida, foi introduzida a ponteira de acrílico de 10 cm no canal do teto, comprimindo-o, para o tratamento no primeiro nível de aplicação (figura 12), relaxando o teto posteriormente e continuando, com o segundo nível da

aplicação (figura 13). Após o tratamento, desinfetavam-se os tetos com solução de iodo e liberava os animais para se alimentarem no cocho. Os tratamentos foram realizados na primeira ordenha do dia. Na segunda ordenha do mesmo dia, observou-se que os primeiros jatos do leite, em alguns animais tratados, apresentavam coloração azulada, sendo este leite descartado até o retorno da coloração, quando o leite era reutilizado para o consumo.

Foram realizados três tratamentos com intervalo de 48 horas entre eles; cada tratamento realizado com dois níveis de aplicação. Cada nível recebeu a densidade de energia correspondente ao grupo a que pertenciam os animais.

As amostras de leite destinadas aos exames a CBT e CCS por citometria de fluxo foram coletadas com intervalo de 24 horas e as amostras de leite para os exames microbiológicos foram coletados a cada 48 horas, seguindo o protocolo descrito anteriormente de assepsia, e antes da primeira ordenha do dia.



Figura 11: Início do tratamento com a introdução da sonda uretral injetando azul de toluidina a 2,5%, após a ordenha.



Figura 12: Primeiro nível do tratamento com o PDT, tentando-se chegar próximo ao parênquima glandular.



Figura 13: Segundo nível do tratamento com o PDT na ponta do teto relaxado.

3.4.2.2 Experimento *In Vivo*, para tratamento de mastite subclínica, através do PDT com o intervalo de 12h e 24h entre as aplicações.

Após os resultados do primeiro ensaio observou-se que o intervalo de 48h entre as aplicações favorecia o desenvolvimento de outros microorganismos causadores de mastite subclínica. Entendeu-se então, que havia necessidade de mais um teste *in vivo* diminuindo, desta vez, o intervalo entre as aplicações e, se possível, determinando uma densidade de energia para o tratamento proposto.

Foram selecionados dois animais, oito tetos, com média do período de lactação de 3,5 meses, dividindo os tetos em três grupos.

- O grupo 1 foi composto de três tetos com mastite subclínica de um mesmo animal, onde se estabeleceu o intervalo de tempo de 12 horas entre as aplicações do tratamento.
- O grupo 2, também composto de três tetos, de um mesmo animal, com mastite subclínica quando se estabeleceu o intervalo de 24 horas entre as aplicações do tratamento.
- O grupo 3, chamado de grupo controle, foi composto de dois tetos sadios, um teto sadio de cada grupo.

O tratamento também consistiu em três aplicações em dois níveis cada, sendo que cada grupo (1 e 2), correspondia ao intervalo de tempo das aplicações 12 e 24h respectivamente. Determinou-se para este ensaio densidade de energia de 75 J/cm^2 com tempo de aplicação 314 segundos em cada nível para os dois grupos, utilizando o aparelho MMOptics® e os mesmos procedimentos do experimento anterior, inclusive a concentração e o volume do agente fotossensibilizante aplicado no teto infectado.

Este tratamento foi realizado sempre na primeira ordenha do dia. As vacas selecionadas entravam na sala de ordenha, o úbere era higienizado e colhiam-se as amostras de leite em frascos estéreis, armazenava-os em caixas isotérmicas com gelo reciclável e enviava-as aos laboratórios. No grupo 1 foram colhidas três amostras de leite com intervalo de 12 horas e no grupo 2 também foram colhidas três amostras de leite com intervalo de 24 horas, sempre antes das ordenhas.

3.4.2.3 Experimento *In Vitro*, em leite mastítico, com Densidade de Energia de 200 J/cm² em três níveis, e uma única aplicação com diferentes concentrações do agente fotossensibilizante

Devido ao tempo de exposição à irradiação, para se atingir a densidade de energia (DE) desejada para o tratamento observou-se a possibilidade de ajustar a DE para uma única aplicação o que se adaptaria melhor ao manejo da propriedade. Assim, decidiu-se fazer o experimento *in vitro* com o leite mastítico oriundo de seis vacas selecionadas, aplicando uma DE, ainda não testada em animais infectados, aproveitando também para testar outras diluições do agente fotossensibilizante e definir o protocolo final para o tratamento de mastite subclínica.

Na primeira ordenha do dia, selecionaram-se seis animais infectados dos quais foram coletados 3000 mL em frascos estéreis de leite infectado e enviados ao Laboratório Óptico Biomédica para execução do ensaio. As amostras de leite foram divididas em quatro grupos sendo que cada amostra participou de todos os grupos. Os grupos foram divididos de acordo com o tipo de tratamento proposto:

- Grupo 1= Controle (somente leite mastítico);
- Grupo 2= PDT (Terapia Fotodinâmica) (leite mastítico + agente fotossensibilizante + laser);
- Grupo 3= Laser (leite mastítico + laser);
- Grupo 4= Azul (leite mastítico + agente fotossensibilizante).

O agente fotossensibilizante usado foi o Azul de Toluidina nas concentrações 2,5%, 1,25% e 0,6%, tanto no grupo 2 como no grupo 4, como demonstrados na tabela 2.

Tabela 2: Representação dos grupos 1, 2, 3 e 4 e a relação das amostras que participaram de cada grupo.

Amostras Animais	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3	Grupo 4		
	Controle	PDT 2,5%	PDT 1,25%	PDT 0,6%	LASER	AZUL 2,5%	AZUL 1,25%	AZUL 0,6%
1	X	-	X	X	X	-	X	X
2	X	-	X	X	X	-	X	X
3	X	-	X	X	X	-	X	X
4	X	X	X	-	X	X	X	-
5	X	X	X	-	X	X	X	-
6	X	X	X	-	X	X	X	-

Legenda: X = participou do experimento naquele grupo, - = não participou do grupo selecionado.

As amostras de leite foram acondicionadas em frascos estéreis de 50 mL para o tratamento *in vitro* e depois de tratadas foram enviadas aos dois laboratórios para a realização dos exames: cultivo, CBT e CCS. O aparelho utilizado foi o Microdont® que ficou fixado na bancada do laboratório, de forma que a ponteira de acrílico ficasse livre e permitisse o encaixe dos frascos contendo o leite a ser tratado. Para simular os níveis da ponteira no interior do teto colocaram-se apoios sob os frascos para simular os três níveis de profundidade da ponteira na aplicação intramamária. Para este tratamento foi calculado e usado uma densidade de energia de 200J/cm² com três níveis de aplicação, que após os cálculos determinou-se o tempo de 262 segundos em cada nível utilizado nos grupos 2 e 3, como mostra as Figuras 14 e 15.

Cálculo da Densidade de Energia (DE):

DE= P xT / S onde,

P= potência emitida pelo aparelho (J),

S= área da ponteira (cm²),

DE= densidade de energia que será aplicado,

T= tempo (s), o que se deseja achar para a aplicação.

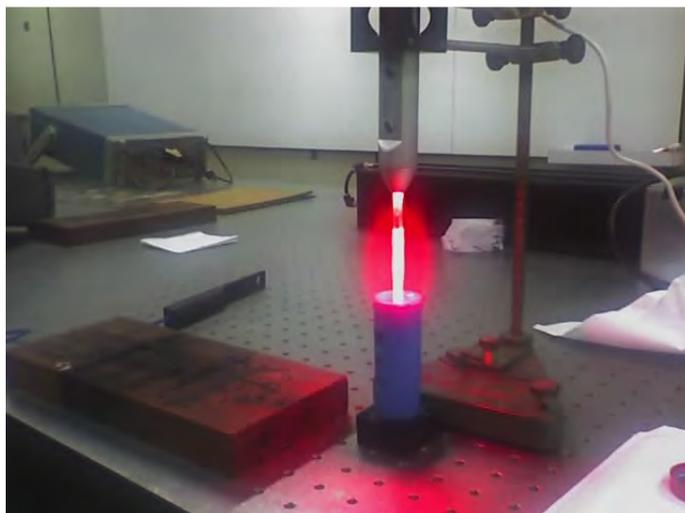


Figura 14: Aplicação *in vitro* de $200\text{J}/\text{cm}^2$ em segundo nível do grupo 2 usando azul de toluidina a 2,5%.

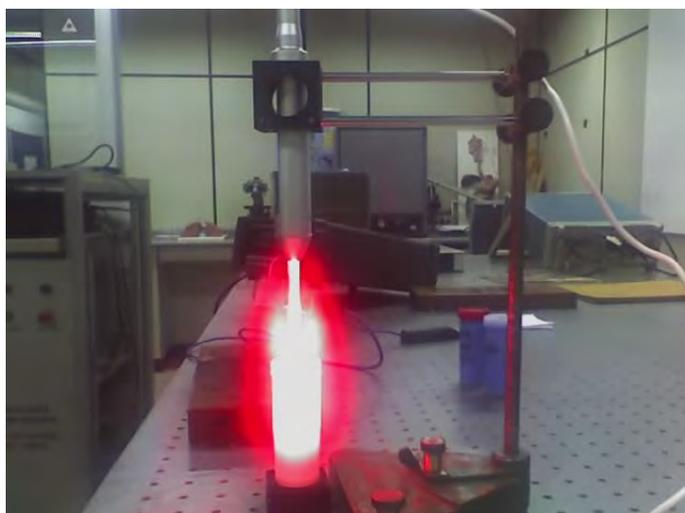


Figura 15: Aplicação *in vitro* de $200\text{J}/\text{cm}^2$ em segundo nível do grupo 3.

3.5. Parte II - Experimentos do Tratamento

3.5.1. Tratamento da Mastite Subclínica através da Terapia Fotodinâmica (PDT)

Após este último experimento, foi definido um protocolo com os procedimentos para tratamento mastite subclínica em vacas que apresentaram CMT positivo. A rotina de limpeza e os procedimentos de assepsia nos tetos que foram tratados para colheita das amostras antes da ordenha foram iguais aos realizados em todos os experimentos.

Para o experimento conclusivo foram utilizados 40 tetos com mastite subclínica, em vacas selecionadas cuja média do período de lactação foi de 7,8 meses. Os tetos foram divididos em quatro grupos para tratamento, conforme o ensaio *in vitro* anterior. Quando uma vaca apresentava mais de um teto com mastite subclínica utilizavam-se todos os tetos infectados, desde que pertencente ao mesmo grupo de tratamento. Os animais foram selecionados ao acaso para participarem dos grupos, conforme abaixo relacionados.

- Grupo 1 = Terapia Foto Dinâmica (PDT usando azul de toluidina a 2,5%) (n=10 tetos);
- Grupo 2 = Laser (n=10 tetos)
- Grupo 3 = Azul de toluidina a 2,5% (n=10 tetos)
- Grupo 4 = Controle (n=10 tetos).

O tratamento foi realizado após a primeira ordenha do dia quando os animais permaneciam contidos na sala da ordenha. Aplicaram-se os mesmos procedimentos de assepsia no teto, a seguir injetava-se 1,0 mL do azul de toluidina a 2,5% conforme protocolo estabelecido. Em seguida, introduziu-se a ponteira de acrílico acoplada ao aparelho Microdont® comprimindo todo o teto na tentativa de alcançar o parênquima glandular, fazendo então a primeira aplicação no primeiro nível, em seguida desceu um pouco mais a ponteira, cerca de quatro centímetros, fazendo-se segunda aplicação no segundo nível na cisterna da glândula. O terceiro nível de aplicação foi realizado na ponta dos tetos, quando estes estavam relaxados.

Desse modo, todo animal tratado recebeu uma única aplicação em três níveis, usando densidade de energia de $200\text{J}/\text{cm}^2$ (262 segundos) em cada nível. Foram colhidas amostras de leite antes do tratamento, 12 e 24 horas após o tratamento, sempre antes da ordenha e enviados ao laboratório.

3.5.2. Tratamento da Mastite Subclínica através da Terapia Fotodinâmica (PDT) em animal de matadouro

Para se verificar que haja possíveis alterações do epitélio mamário causadas pelo uso do PDT *in vivo*, uma vaca, destinada ao abate, foi tratada simulando-se metodologia idêntica à empregada nos tratamentos de animal com mastite subclínica, ou seja, uma única aplicação em três níveis de profundidade com $200\text{ J}/\text{cm}^2$ (262 segundos) em cada nível, utilizando o azul de toluidina a 2,5% como agente fotossensibilizante (figura 16). Separaram-se dois tetos, um teto para o tratamento e outro para controle. Após a realização do tratamento, aguardou-se 24h para o abate do animal, colheram-se amostras dos dois tetos (figura 17), fixou-as em solução formol a 2% e enviou-as ao laboratório de histologia da UNESP/ São José dos Campos, para exame histológico.



Figura 16: Vaca tratada no matadouro a 24 horas antes do abate.

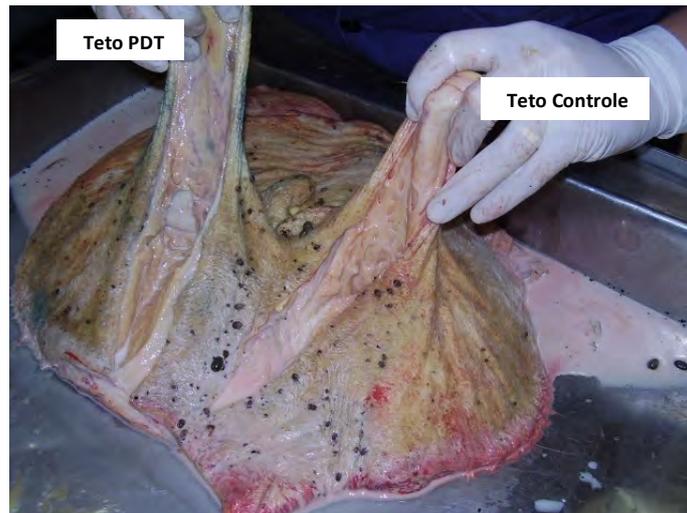


Figura 17: Úbere de animal tratado no matadouro 24 horas depois, avaliação macroscópica do teto tratado através do PDT e teto controle.

3.5.3 Procedimento Laboratorial

As amostras de leite foram enviadas ao Laboratório Quaglia de São José dos Campos onde foi feito o isolamento e a Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras duplicadas, para aerobiose e microaerofilia. No laboratório, essas amostras foram homogeneizadas coletando-se uma alíquota de 0,01mL, que era semeados na superfície de Agar sangue (Blood Agar base – Difco®) com sangue de carneiro desfibrinado (Newproo®) a 5% e incubados em estufa bacteriológica a 37° C. As leituras foram realizadas 24 e 48 horas após incubação. Inicialmente observaram-se as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, coloração e presença de hemólise.

Na microscopia, foi observada a morfologia, a disposição das células e características tintoriais ao Gram. Realizou-se a prova da catalase de acordo com SCHALM et al. (1971) para a diferenciação entre estafilococos e estreptococos. As bactérias identificadas como *Staphylococcus* eram submetidas à prova de coagulase para diferenciação entre *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus* coagulase negativo. As bactérias identificadas como *Streptococcus* foram submetidas à prova de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), crescimento variável em meio contendo 6,5% de NaCl, crescimento em meio Agar bile-esculina e PYR Test (Probac®).

As bactérias identificadas como bacilo Gram negativos foram semeadas no meio Rugai & Araujo modificado por Pessoa & Silva e logo em seguida colocados em kits bioquímicos, API 20 E (Biomérieux ®), para o possível diagnóstico.

As bactérias identificadas como bacilo Gram positivos foram submetidas à prova da catalase, crescimento em meio Agar bile-esculina, teste da fermentação no Agar manitol.

A contagem bacteriana total (CBT) foi realizada considerou-se a diluição inicial de 1:10, obtendo-se as diluições 1:100, 1:100.000 e 1:1000.000, a partir das quais foi feita a semeadura na superfície de Agar sangue (Blood Agar base – Difco®) com sangue de carneiro desfibrinado (Newproo®) a 5% e incubados em estufa bacteriológica a 37° C, as leituras efetuadas com 24 e 48 horas após a incubação.

Para a CBT de *Streptococcus* spp, foi realizado nos microrganismos isolados em microaerofilia nas mesmas diluições, no mesmo meio de cultura e procedimento de leituras. Todos os microrganismos isolados em aerobiose e microaerofilia da CBT foram identificados

em todas as diluições e só foi considerada a contagem dos microorganismos que foram isolados quando também encontrados em amostras puras de leite, de acordo com BRITO & BRITO (1999).

3.5.4 Procedimento Histológico

Amostras do experimento, em peça fresca e animal tratado no matadouro, foram fixados em formol a 2% e encaminhadas para o Laboratório de Histologia da UNESP São José dos Campos/SP para investigação de possíveis lesões causadas pelo efeito do PDT no momento após a aplicação e 24h depois. Lâminas histológicas do experimento, no animal destinado ao abate, foram examinadas na microscopia óptica 10x, 20x e 40x, avaliando-se as diferenças histológicas entre o teto tratado e o teto controle.

3.6. Análises Estatísticas

Em todos os experimentos foi utilizada ANOVA (análise de variância) com intervalo de confiança de 5%. O cálculo do número das amostras utilizadas e o cálculo da prevalência foram realizados com base na prevalência estimada para mastite subclínica, por meio do estudo de dispersão de frequência, fórmulas encontradas em SAMPAIO (2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização do presente estudo, foram examinadas 164 vacas em diferentes momentos da lactação, no período de abril a outubro de 2007 e os dados estão representados na Tabela 3 demonstrados na frequência comparando o número de vacas e tetos examinados.

Tabela 3: Frequência dos dados encontrados em relação a vacas e tetos.

Dados encontrados	Vacas	Tetos
Nº total examinados	164	632
Nº total mastite subclínica	109	177
Nº total de mastite subclínica que evoluiu para mastite clínica	31	37
Nº total de presença de grumos no leite na mastite clínica	29	49
Presença de mastite subclínica no final da lactação e após o parto	10	11
CMT negativo espontaneamente de mastite subclínica após o parto	8	17
CMT negativo espontaneamente de mastite subclínica durante a lactação	6	6

Foram realizados 6.978 exames de CMT para detecção da mastite subclínica. Os resultados do CMT estão apresentados na Tabela 4, demonstrando o número de exames reagentes e o percentual pelo grau de celularidade: 0, 1+, 2+ e 3+ na detecção da mastite subclínica.

Tabela 4: Número de exames (CMT) realizados correlacionando o grau de positividade.

Grau	Exames realizados com o CMT	
	Número de exames Reagentes	Percentual (%)
0	565	8
1+	3910	56
2+	989	14
3+	1514	22
Total	6978	100

HARROP et al. (1975), estudando a incidência da mastite bovina procedentes do Agreste Meridional de Pernambuco, encontraram 39,0% das vacas reagentes ao CMT e destes 31,2% estavam com infecções no úbere detectadas pelo exame bacteriológico, dados também encontrados por NADER FILHO et al. (1985) na região de Ribeirão Preto, SP, em que verificaram a prevalência da mastite bovina em 11,9% das vacas reagentes ao CMT em que 11,1% foram confirmadas através do isolamento microbiano e por RIBEIRO et al. (2003) que encontraram 39,17% casos de mastite subclínica e 1,48% de mastite clínica na região Sul do Rio Grande do Sul, com 33,39% reagentes ao exame CMT no nível 3+, dados superiores do presente estudo em que obteve-se 22% dos animais reagentes ao CMT no grau 3+.

COSTA et al. (1995) relataram os índices de ocorrência de mastite subclínica e clínica, na ordem de 72% e de 17,5% para os Estados de Minas Gerais e São Paulo respectivamente. No presente trabalho observou-se a prevalência de 66,5% dos animais acometidos com mastite, deste montante 71,6% de mastite subclínica e 28,4% para a mastite clínica. Considerando a prevalência estimada para a região de 72% de mastite subclínica, observou-se que ocorreu correlação significativa ($r_s=0,073$, $p=5\%$) entre o número de animais examinados e o número de animais positivos, e que há uma nova prevalência estimada para a fazenda de estudo (73%).

Das 496 amostras de leite examinadas para os tratamentos foram isolados microrganismos em 42,3% nas amostras. Na Tabela 5 podemos observar a distribuição dos microrganismos isolados causadores de mastite subclínica.

Tabela 5: Distribuição dos microrganismos isolados nas amostras de leite infectadas.

Microrganismos isolados	%
Estafilococos coagulase negativos	50,9%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	15,7%
<i>Bacillus</i> sp.	14,8%
<i>Corynebacterium</i> sp.	10,5%
<i>Streptococcus bovis</i>	2,9%
<i>Escherichia coli</i>	2,3%
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	1,4%
<i>Klebsiella</i> sp.	0,9%
<i>Streptococcus uberis</i>	0,9%

PARDO et al.(1999) ao realizarem o levantamento dos agentes etiológicos das mastites no município de Arapongas (PR) encontraram uma frequência de 55,08%. Relataram ainda que a porcentagem de amostras mastíticas microbiologicamente positivas em seu estudo foi de 79,31%; maior do que a observada por ADORNES et al. (1995) quando encontraram 51,5% de mastites de origem infecciosa, no levantamento realizado no município de Rio Grande (RS) e por MARTINS et al. (1995), 55,48% encontrado na região sul do país, frequência superior aos 42,3% encontrado no presente estudo. PARDO et al.(1999) reportaram ainda que o microrganismo mais frequente foi *Staphylococcus* spp., correspondendo à frequência de 53,67%, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Cita também este autor que destes, 43,06%, foram observados em mastite subclínica, dados também similares aos resultados observados na pesquisa em pauta.

FREITAS et al. (2005), ao examinarem leite de vacas com mastite na região do agreste do Estado de Pernambuco, verificaram que os agentes com maior prevalência foram Estafilococos coagulase negativa 36%, *Corynebacterium* spp. 34,8%, *S. aureus* 13,6%, *Bacillus* sp. 5,3%, *Streptococcus* spp. 3,8% e *Escherichia coli* 0,4%. Pela análise dos resultados da presente pesquisa observou-se que, dos isolamentos para ECN, *Streptococcus* spp., *Bacillus* sp. e *E. coli* foram superiores aos dados reportados por FREITAS et al. (2005), enquanto que *Corynebacterium* sp. e *S. aureus* foram inferiores ao reportado por estes autores. Entretanto, foram superiores às observações de PITKÄLÄ et al. (2004) quando estudaram etiologia das mastites bovina na Finlândia, ao encontrarem 46,9% para ECN e inferiores dos 34,4% para *Corynebacterium bovis* também relatado pelo autor.

LANGONI et al. (1990) encontraram, em seus estudos sobre mastite subclínica, a seguinte ocorrência de agentes: *S. aureus* 36,9%, *S. epidermidis* 22,2%, *C. bovis* 4,8%. *C. pyogenes* 4,4%, *S. uberis* 4,3%, *E. coli* 4,0%, *S. dysgalactiae* 3,8%, *S. agalactiae* 3,7% e *Candida albicans* 3,8%. Estes resultados confirmam a etiologia dos patógenos causadores das mastites quando comparados com os isolamentos do presente trabalho, 15,7% *Streptococcus dysgalactiae*, 0,9% *Streptococcus uberis*, 2,9% *Streptococcus bovis*, 2,3% *Escherichia coli* e 10,5% *Corynebacterium* sp. No entanto, nota-se que alguns patógenos podem aparecer com maior frequência, como é o caso do *S. aureus*, citado no trabalho de LANGONI et al. 1990 e *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium* sp., da investigação em pauta, fato que pode estar relacionado com o manejo dos animais, mostrando a relevância desses microrganismos como causadores de mastite subclínica.

ADORNES et al. (1995) relataram que um dos microrganismos mais isolados nas infecções é *Corynebacterium bovis* ressaltando a sua importância como agente etiológico causador de mastite que foram observados em trabalhos de levantamento. COSTA et al.

(1985) isolaram *C. bovis* em 32,50% de um total de 2.935 amostras em 17 municípios do Estado de São Paulo, e no presente trabalho foram isolados 10,5% *Corynebacterium* sp., mostrando a importância deste microrganismo como agente causador de mastite subclínica.

4.1. Parte I – Resultados dos Pilotos Experimentais

4.1.1. Experimentos para testar as ponteiros de acrílico adaptadas

Para a definição de um protocolo de procedimentos para tratamento da mastite subclínica, foram realizados experimentos para adequação dos aparelhos LEDs emissores de raios laser e determinou-se a densidade de energia medida em joules por centímetros quadrados (J/cm^2) associado à concentração ideal do agente fotossensibilizante, cujos resultados estão relacionados a seguir.

Como os aparelhos LEDs não são próprios para tratamento intramamário, houve a necessidade de serem realizados experimentos para a adequação dos mesmos para a execução do projeto proposto. Constatou-se que ao acoplar a ponteira de acrílico ao aparelho MMOptics®, a potência de saída na porção final da ponteira reduziu de 80mW para 30 mW e quando adaptado no aparelho Microdont® a potência de saída reduziu de 400mW para 150 mW na saída.

4.1.1.1 Comparação entre os dois aparelhos (experimento *in vitro*)

Para a aferição de adaptação feita nos aparelhos LEDs emissores de raio laser com as ponteiros alongadas, foram realizados experimentos para padronizar a intensidade de emissão de luz. Os resultados deste experimento estão representados na Figura 18 onde a linha vermelha representa a emissão de raio ao longo da ponteira adaptada no aparelho Microdont® e a linha azul do aparelho MMOptics®.

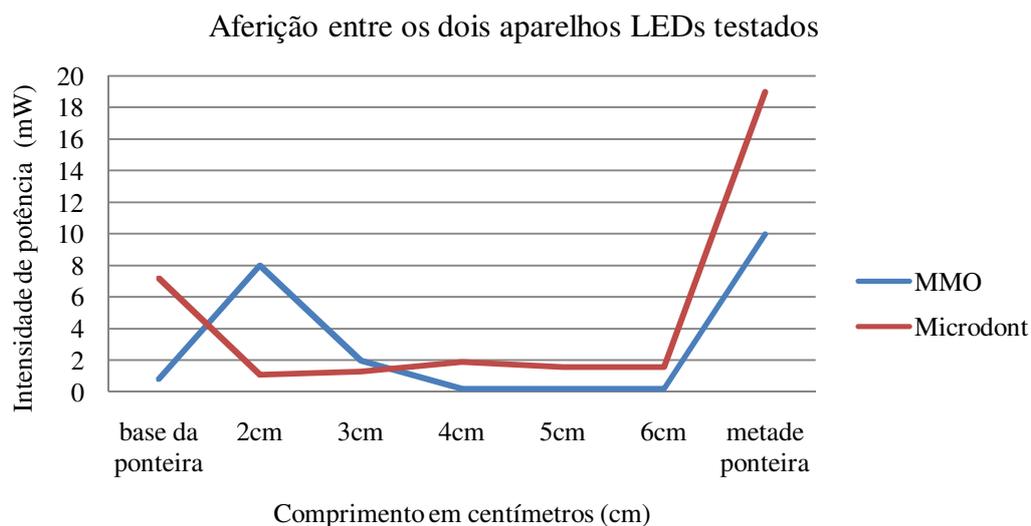


Figura 18: Aferição dos aparelhos testados MMOptics® e Microdont®.

Após a aferição dos aparelhos, para o próximo ensaio, utilizou-se leite infectado com mastite subclínica sem e com o agente fotossensibilizante adicionado em várias diluições. Os resultados deste experimento estão representados na Tabela 6, comparando a intensidade de potência dos aparelhos MMOptics® e Microdont® em miliwatts (mW) em proveta testando

três profundidades de penetração, simulando a penetração no interior do teto até próximo ao parênquima glandular.

Tabela 6: Determinação das Intensidades de potências de raio laser na proveta vazia, com leite sem e com fotossensibilizante (azul de toluidina) a 2,5%.

Intensidade de Potência dos Aparelhos MMO e Microdont em miliwatts (mW)												
Distância da profundidade de aplicação (cm)	Sem leite		Com leite									
	Proveta Vazia		Proveta com leite puro		Leite+Azul toluidina 50ml/1ml		Leite+Azul toluidina 100ml/1ml		Leite+Azul toluidina 200ml/1ml		Leite+Azul toluidina 200ml/1ml - Sensor na lateral da proveta	
	MMO	Microdont	MMO	Microdont	MMO	Microdont	MMO	Microdont	MMO	Microdont	MMO	Microdont
0	25	35	10	20	4	7	8	16	7	16	0,045	0,1
5	8	8	0,03	0,04	0,015	0,015	0,018	0,018	0,02	0,030	0,015	0,016
10	6	4,5	0,03	0,030	0,015	0,015	0,018	0,018	0,023	0,020	0,020	0,032

Foram observados, com estes resultados, que os aparelhos emitiam pouca intensidade de potência quando submetido às profundidades da proveta. Quanto maior fosse a penetração contendo a solução, menor seria a irradiação emitida para o meio, mesmo nas diferentes diluições do agente fotossensibilizante. Assim, a irradiação emitida na porção final da ponteira adaptada de cada aparelho, ficou sendo definido como a densidade de potência utilizada nos experimentos, ou seja, para o aparelho MMOptics® a densidade de potência de 30mW e para o aparelho Microdont® a densidade de potência de 150mW, onde se calculou as densidades de energia do estudo proposto.

4.1.1.2. Resultados Histológicos em Peça Fresca de Matadouro

Observou-se na peça fresca (úbere coletado em matadouro) submetida ao tratamento com laser em diferentes densidades de energia, a conservação de todas as estruturas histológicas inerentes aos processos inflamatórios decorrentes de mastite subclínica e clínica. Não se observaram lesões no epitélio e estruturas adjacentes em consequência da irradiação e do agente fotossensibilizante utilizado, como mostrado na Figura 19.

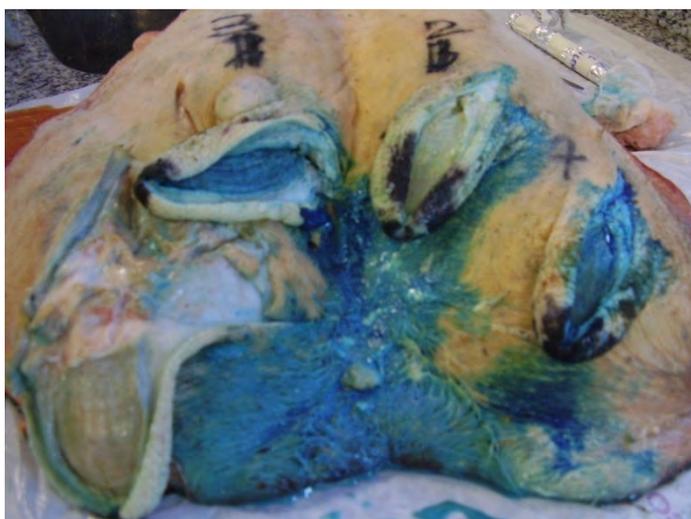


Figura 19: Aspecto anatomopatológico do úbere fresco irradiado em diferentes densidades de energia.

Assim, na peça fresca irradiada, no teto 1 irradiado com $25\text{J}/\text{cm}^2$ foi observado um processo inflamatório crônico com segregação do epitélio glandular pelo processo inflamatório conforme apresentados na Figura 20.

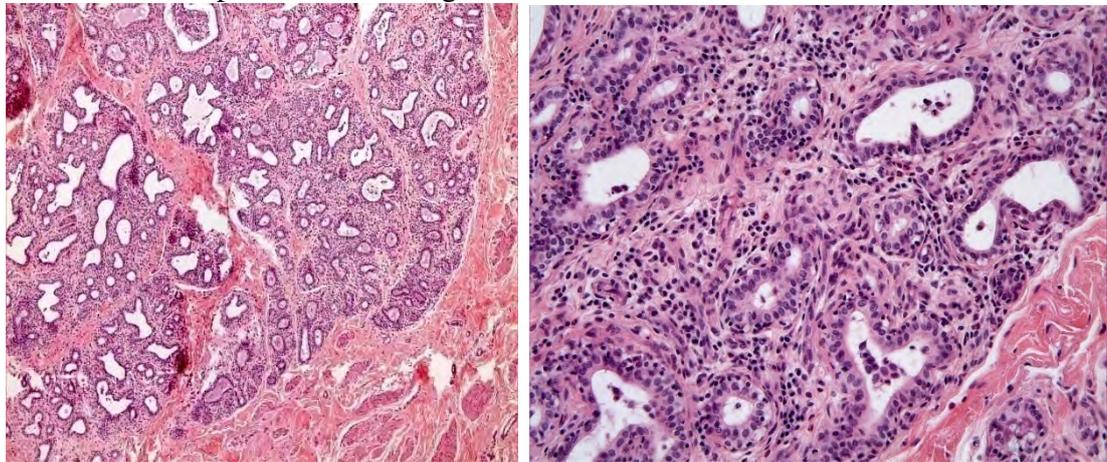


Figura 20: Corte histológico do teto 1 que recebeu densidade de energia $25\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 5x e 20x respectivamente, processo inflamatório característico de mastite subclínica.

No teto 2, que foi irradiado $50\text{J}/\text{cm}^2$, foi observado um processo inflamatório leve com numerosos polimorfonucleares dentro dos ductos alveolares, conforme apresentados na Figura 21.

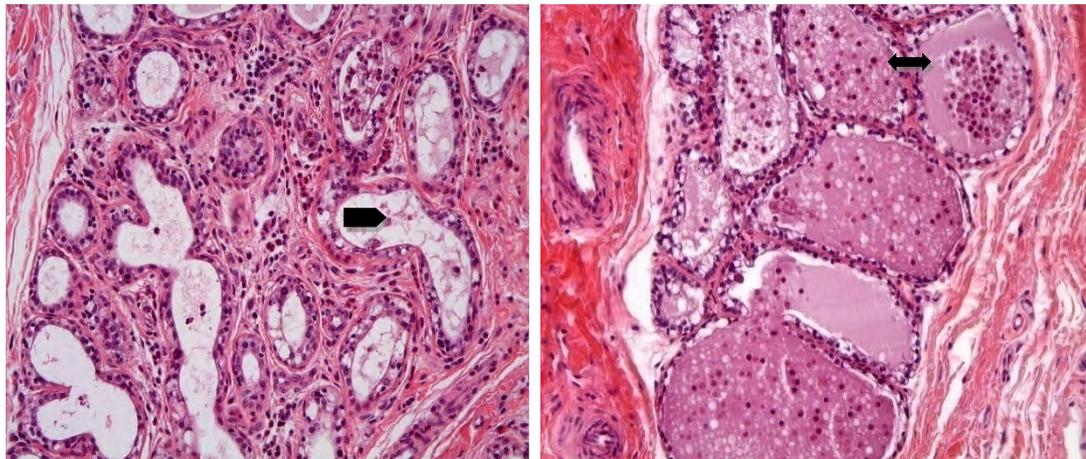


Figura 21: Corte histológico do teto 2 que recebeu densidade de energia $50\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 20x, processo inflamatório característico de mastite subclínica com secreção dentro dos alvéolos com a presença de polimorfonucleares.

No teto 3, irradiado com $75\text{J}/\text{cm}^2$, foi observado um epitélio atípico com segregação e estratificado, projetando-se para o lúmen e grande número de polimorfonucleares, caracterizando uma mastite clínica, conforme apresentado na Figura 22.

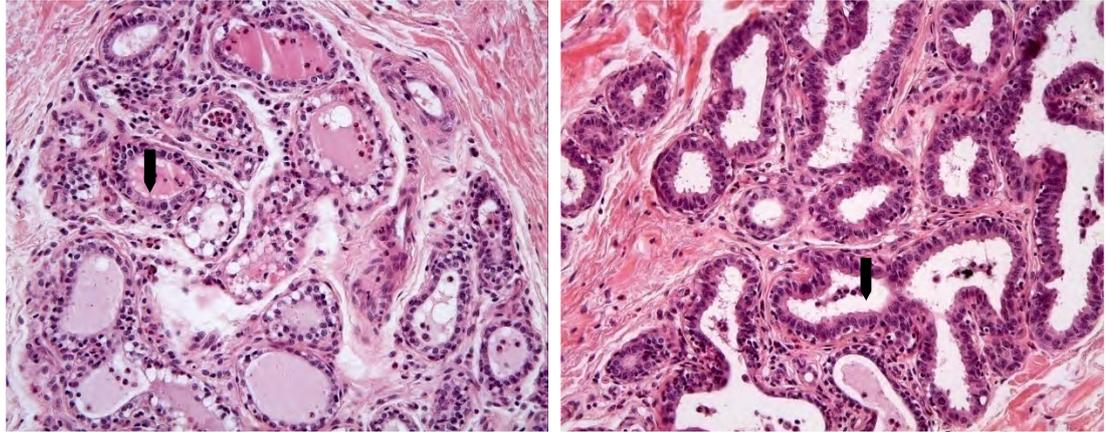


Figura 22: Corte histológico do teto 3 que recebeu densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento de 20x, processo inflamatório crônico com aspectos característicos de mastite clínica.

No teto 4, irradiado $100\text{J}/\text{cm}^2$, foi observado um epitélio íntegro com bastantes células inflamatórias, alvéolos atípicos com células e núcleos achatados, caracterizando uma degeneração, sendo um teto afuncional provavelmente devido à mastite clínica que sofrera em um período anterior (figura 23).

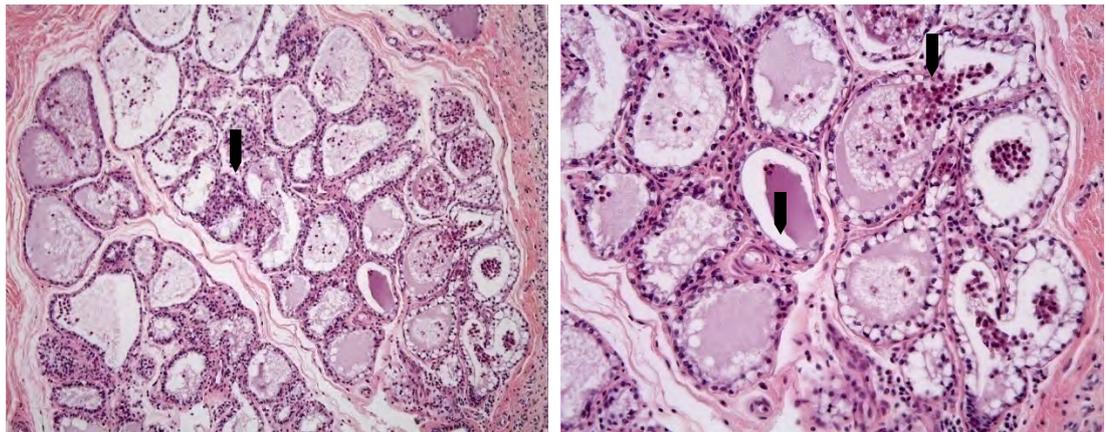


Figura 23: Corte histológico do teto 4 que recebeu densidade de energia $100\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 10x e 20x respectivamente, epitélio íntegro com bastantes células inflamatórias, alvéolos atípicos com células e núcleos achatados, caracterizando uma degeneração.

4.1.2. Experimentos para Determinar a Densidade de Energia (DE)

4.1.2.1. Experimento *In Vivo*, para tratamento de mastite subclínica, através do PDT com o intervalo de 48, 24 e 12h entre as aplicações

Para que este tratamento tenha efeito, há a necessidade de que a irradiação seja associada à agente fotossensibilizante (FS), corante, que determina alterações fotoquímicas na célula microbiana, potencializando a ação do laser e conseqüentemente promovendo a eliminação do microrganismo.

No primeiro ensaio *in vivo*, 12 animais foram reunidos em cinco grupos. Tais grupos foram tratados com uma dosagem de densidade de energia (DE) diferente recebida, e os intervalos dos tratamentos foram a cada 48h entre cada aplicação, realizados em dois níveis de profundidade, totalizando três aplicações, representados na Tabela 7.

Tabela 7: Grupos tratados com PDT *in vivo*, a cada 48h, com diferentes densidades de energia, para o tratamento de mastite subclínica.

Distribuição dos Grupos tratados com o intervalo de 48h entre as aplicações		
Grupos	Densidade de Energia (J/cm ²)	Número Tetos
1	25 (104s)	2
2	50 (209s)	2
3	75 (314s)	2
4	100 (418s)	2
5	Controle (sadio)	4

Para o ensaio experimental seguinte utilizou-se o intervalo entre os tratamentos de 24h e 12h, em dois animais (oito tetos) selecionados, infectados com mastite subclínica. Os tetos foram divididos em três grupos como podem ser vistos na Tabela 8. O tratamento também consistiu em três aplicações em dois níveis de profundidade em cada grupo. Determinou-se para este ensaio a densidade de energia (DE) 75 J/cm² (tempo de aplicação 314 segundos em cada nível).

Tabela 8: Grupos tratados com PDT *in vivo* a cada 24h e 12h com a densidade de energia (75 J/cm²) no tratamento de mastite subclínica.

Densidade de Energia aplicada 75 J./cm ² (314s)		
Grupos	Intervalo de tempo entre as aplicações (horas)	Número Tetos
1	12h	3
2	24h	3
3	Controle (sadio)	2

Foram realizados exames para Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem Células Somáticas (CCS) por citometria de fluxo e isolamento microbiano em cada grupo de estudo. Nos ensaios com intervalos de 48, 24 e 12 horas entre as aplicações do tratamento, as amostras foram colhidas sempre antes dos tratamentos propostos. Os resultados estão expostos para Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS), de acordo com o intervalo de tempo entre os tratamentos.

4.1.2.2 Contagem Bacteriana Total (CBT)

Os resultados de CBT por citometria de fluxo referentes aos ensaios com intervalo de 48 horas entre as aplicações do tratamento em diferentes densidades de energia estão apresentados nas figuras 24, 25, 26 e 27 para cada uma das densidades de energia testadas (25 J/cm², 50 J/cm², 75 J/cm² e 100 J/cm²), respectivamente.

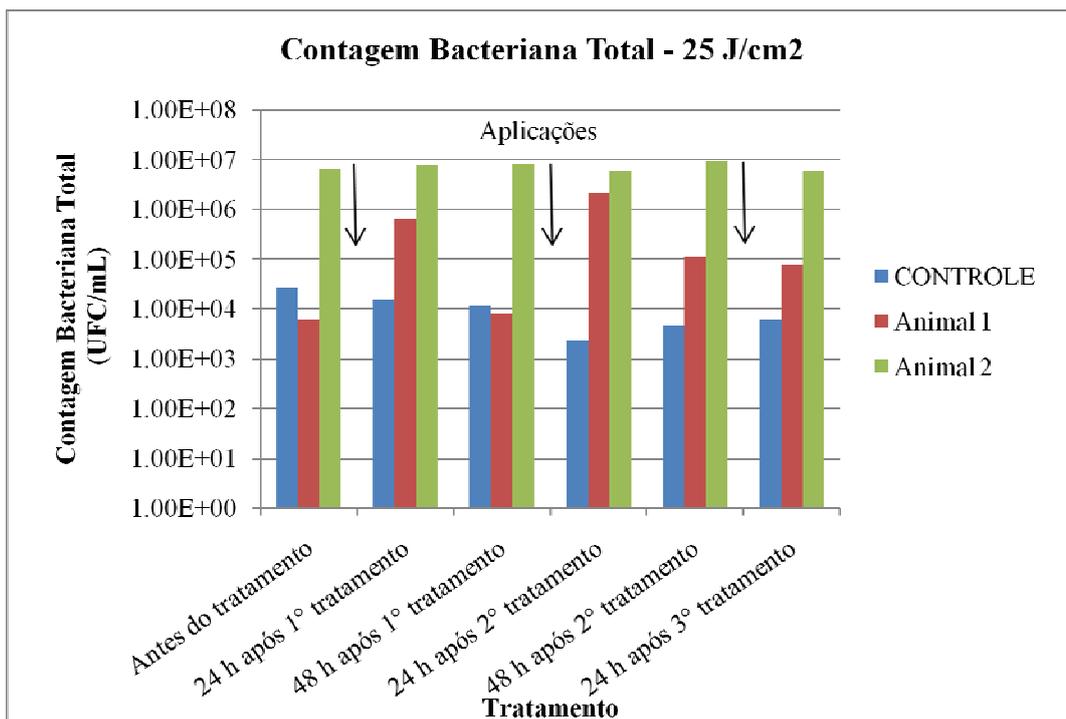


Figura 24: Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia 25J/cm², intervalo de 48h entre as aplicações.

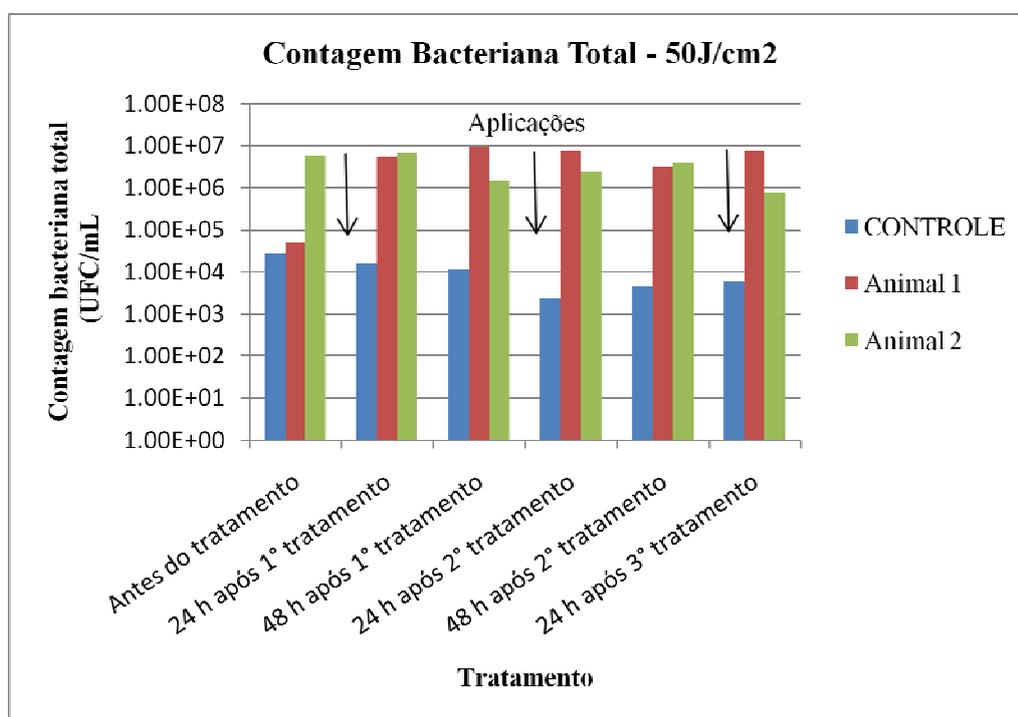


Figura 25: Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia 50J/cm², intervalo de 48h entre as aplicações.

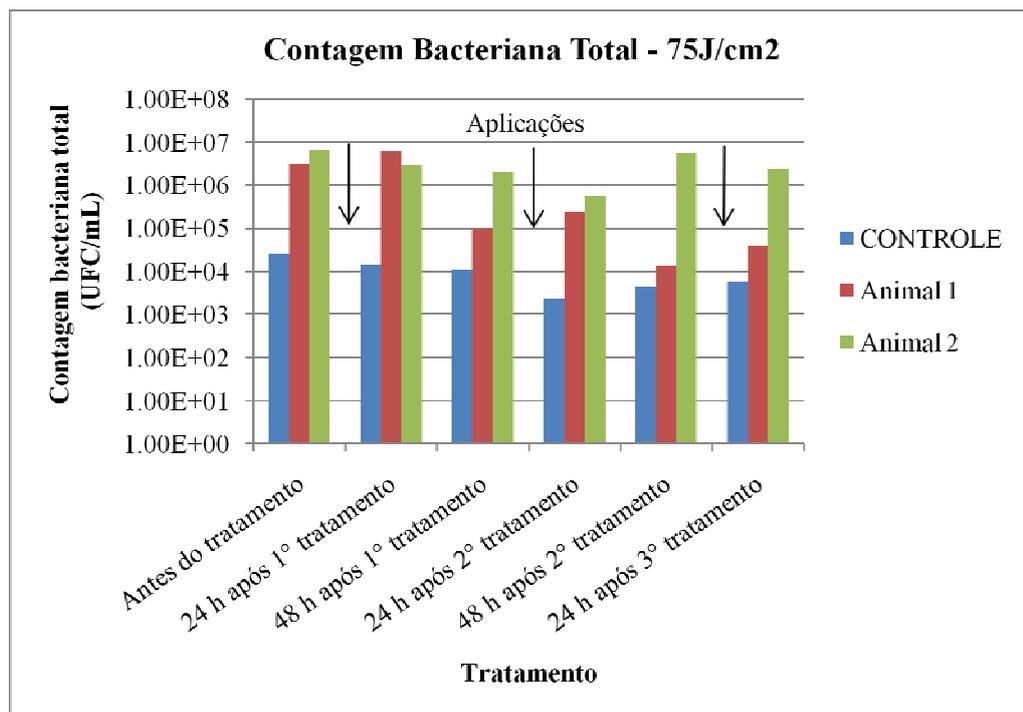


Figura 26: Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia de 75J/cm², intervalo de 48h entre as aplicações.

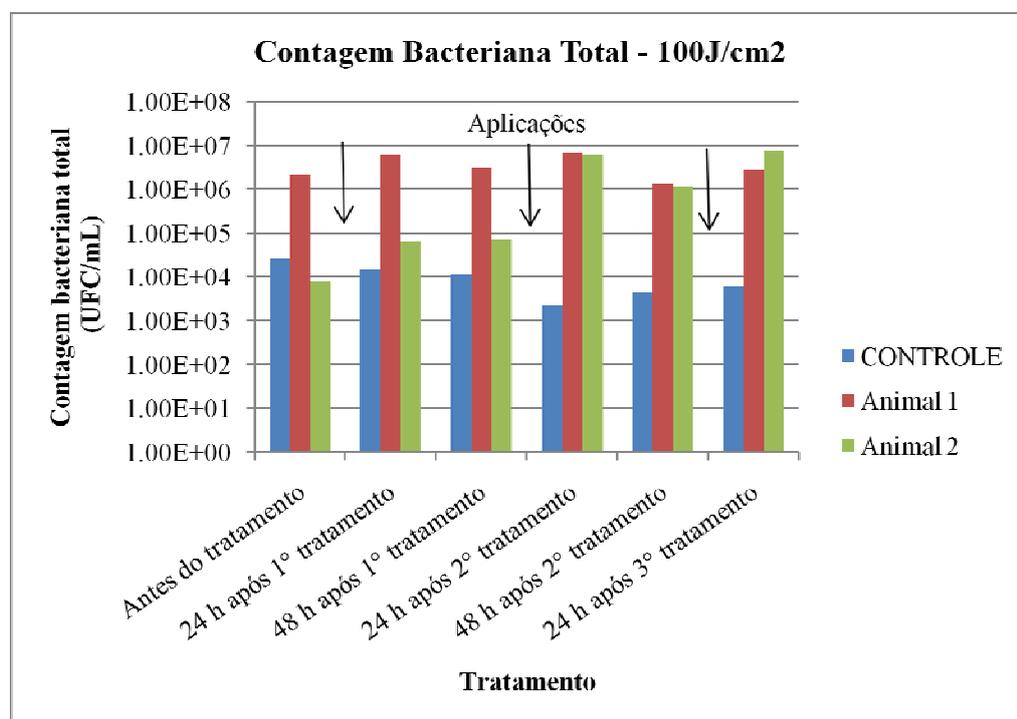


Figura 27: Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia de 100J/cm², intervalo de 48h entre as aplicações.

Os resultados de CBT referentes aos ensaios com intervalo de 12 horas entre os tratamentos estão representados na Figura 28 que mostra os resultados do grupo 1. Os ensaios

com intervalo de 24 horas entre os tratamentos estão representados na Figura 29 para o grupo 2, ambos os grupos com DE 75J/cm², em cada tratamento.

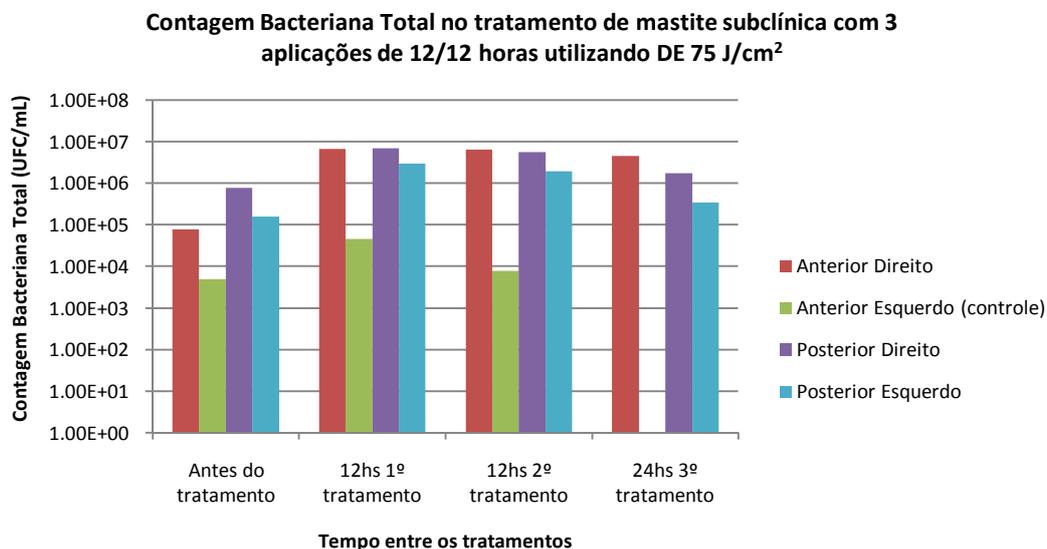


Figura 28: Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia 75J/cm² intervalo de 12h entre as aplicações.

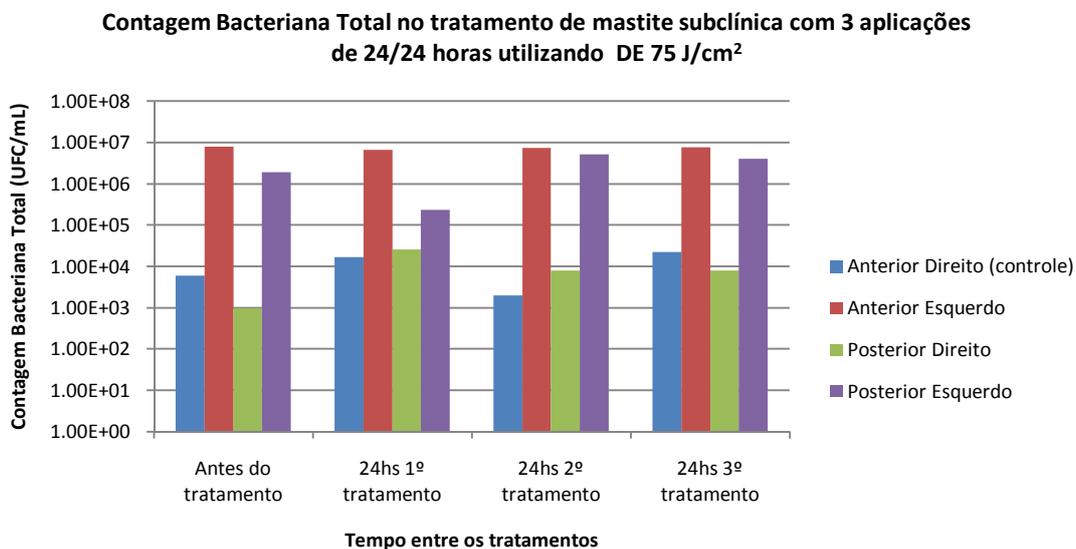


Figura 29: Contagem Bacteriana Total por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia 75J/cm² intervalo de 24h entre as aplicações.

Após as análises dos resultados obtidos na CBT por citometria de fluxo, foi realizado tratamento estatístico por ANOVA em todos os intervalos entre as aplicações (48, 24 e 12h) com o intervalo de confiança de 5%. Observou-se que as DE 25J/cm², 50J/cm², 75J/cm², no intervalo de 48h entre as aplicações do tratamento apresentaram diferenças significativas entre elas ($f_{cal.} > f_{tab}$), $p < 0,05$. Para DE 75J/cm² no intervalo de 12h entre as aplicações também

apresentou diferença significativa, quando comparada com os outros intervalos de aplicação (24h e 48h).

Observou-se que a CBT por citometria de fluxo do presente estudo não reduziu após os tratamentos como era esperado. Este fato pode ter ocorrido porque a dosagem da Densidade de Energia (DE), utilizada em cada ensaio, poderia ter sido insuficiente para estimular as moléculas do corante depositado no organismo alvo, ou a concentração do FS inicial não teria sido suficiente para desencadear a reação deletérea no microrganismo encontrado, como os estudos relatados por SOUKOS et al. (1996), corroborando com as pesquisas de OKAMOTO et al. (1990) que estudaram o efeito da irradiação de laser em várias potências de energia, resultando em morte de microrganismos ou inibição parcial seu do crescimento em culturas *in vitro*.

Assim, pode-se dizer, pelos resultados obtidos, que há diferenças na resposta microbiana quando se utiliza várias DE, corroborando com SOUKOS et al. (1996) que relataram a relação dos parâmetros em que o efeito do PDT é dependente, como o comprimento de onda, densidade de potência, densidade de energia e concentração do fotossensibilizador utilizado para se obter o efeito bactericida desejado.

4.1.2.3. Contagem de Células Somáticas (CCS)

Outro parâmetro analisado por citometria de fluxo foi a Contagem Células Somáticas (CCS) nos tratamentos *in vivo* para determinar a densidade de energia e o intervalo entre os tratamentos para a cura da mastite subclínica. Os resultados obtidos para CCS estão dispostos nas figuras 30, 31, 32 e 33 referentes ao ensaio com o intervalo entre as aplicações de 48h utilizando DE 25J/cm², 50J/cm², 75J/cm² e 100J/cm², respectivamente.

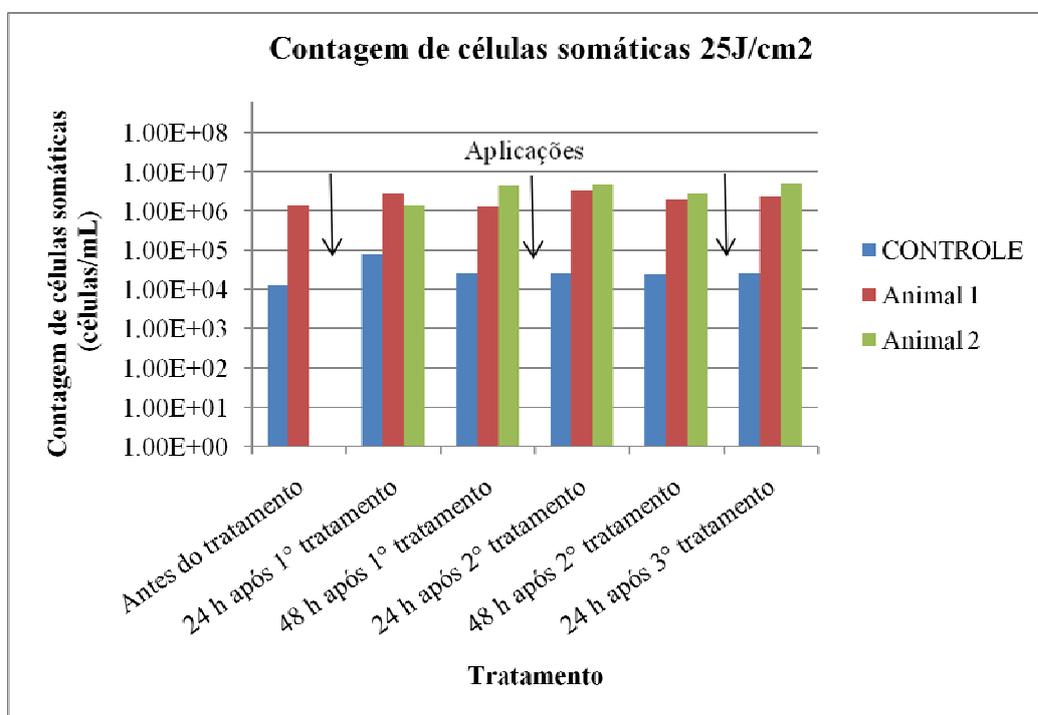


Figura 30: Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia de 25J/cm², intervalo de 48h entre as aplicações.

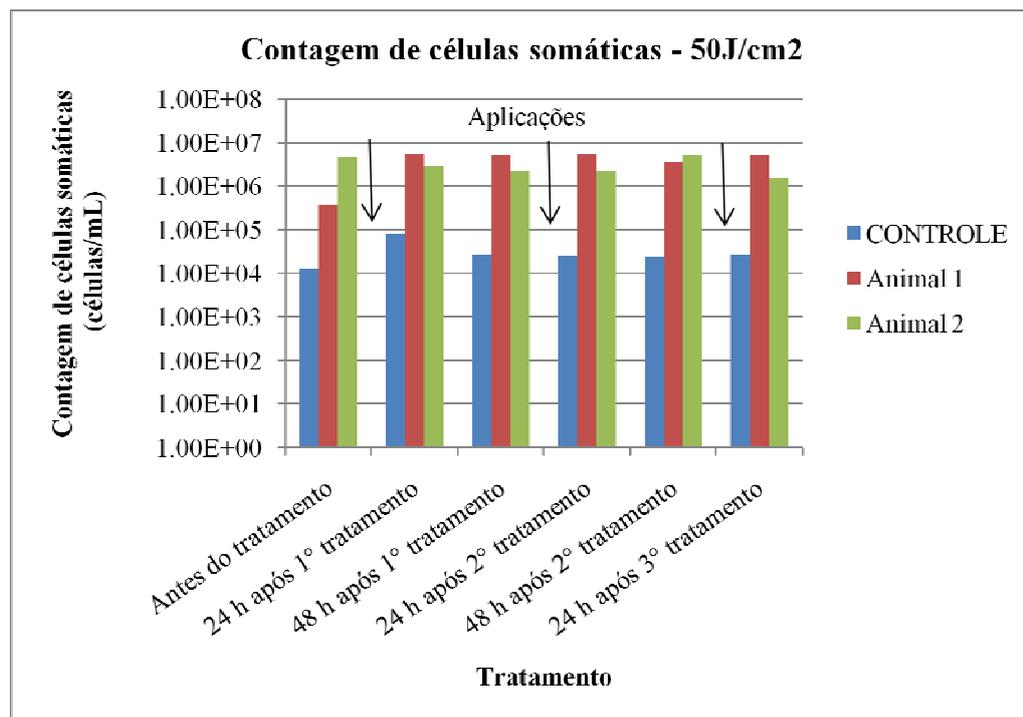


Figura 31: Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia 50J/cm², intervalo de 48h entre as aplicações.

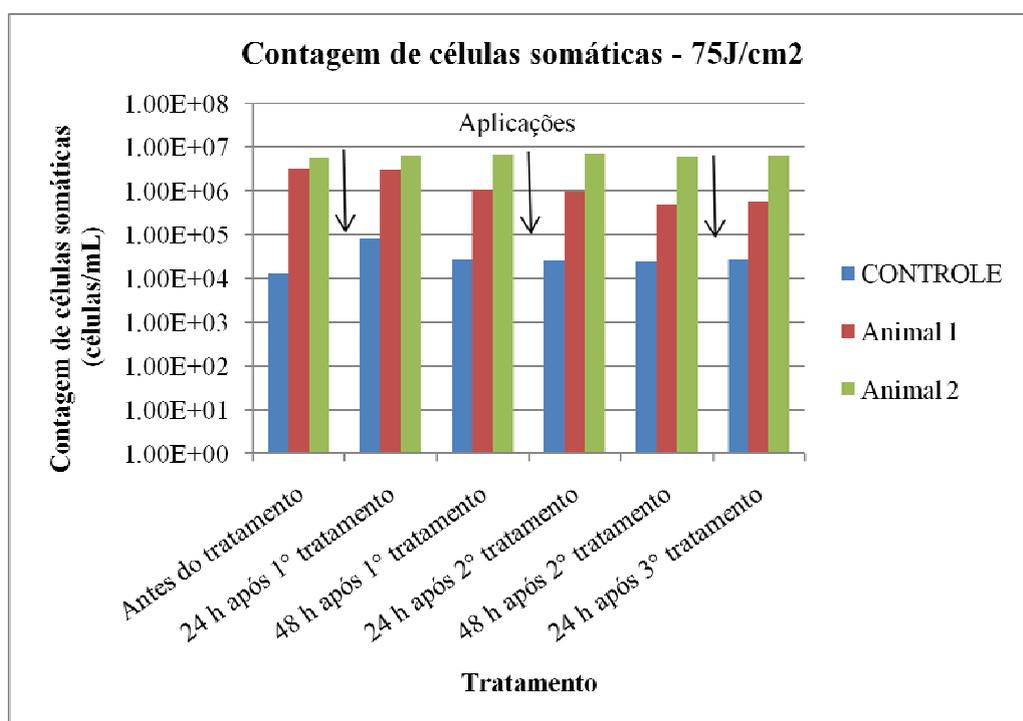


Figura 32: Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia 75J/cm², intervalo de 48h entre as aplicações.

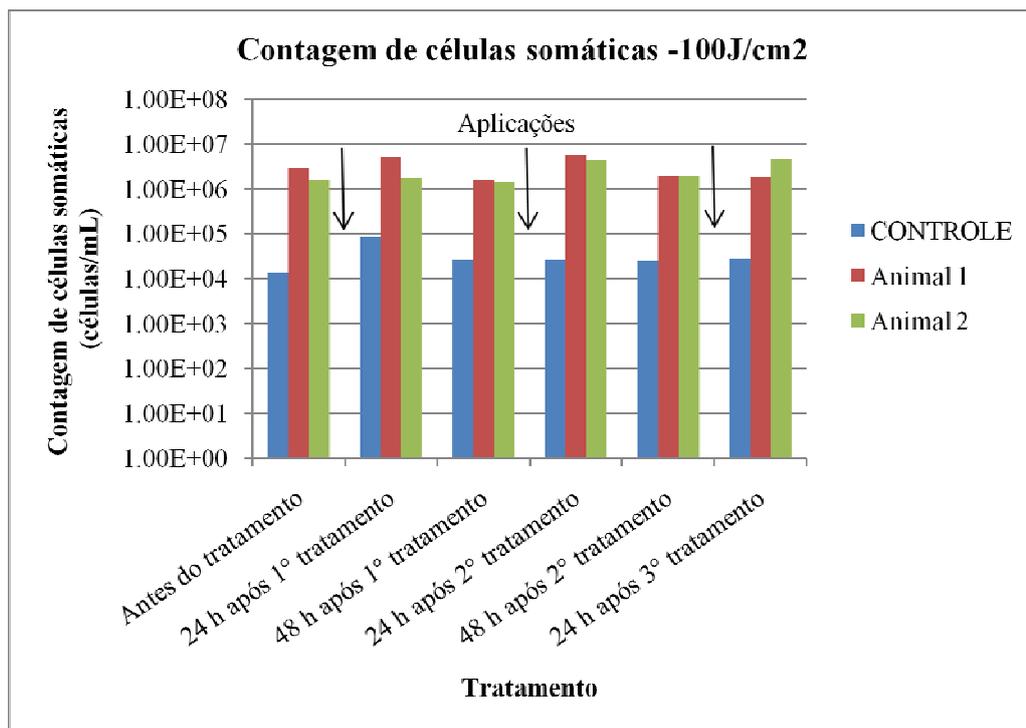


Figura 33: Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $100\text{J}/\text{cm}^2$, intervalo de 48h entre as aplicações.

Nas figuras 34 e 35 observam-se os resultados obtidos para Contagem de Células Somáticas por citometria de fluxo, referentes ao ensaio com o intervalo entre os tratamentos de 24h e 12h respectivamente, utilizando DE $75\text{J}/\text{cm}^2$.

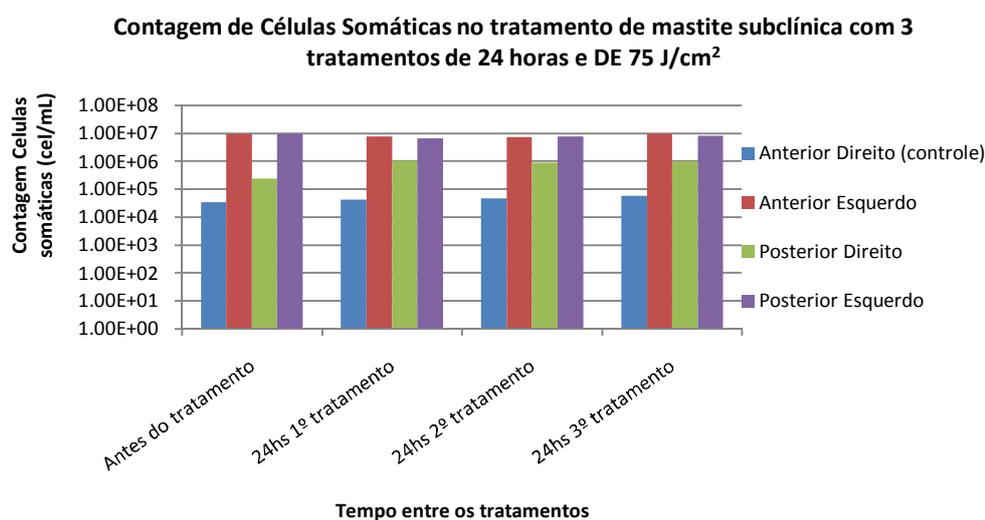


Figura 34: Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia $75\text{J}/\text{cm}^2$ e intervalo de 24h entre os tratamentos.

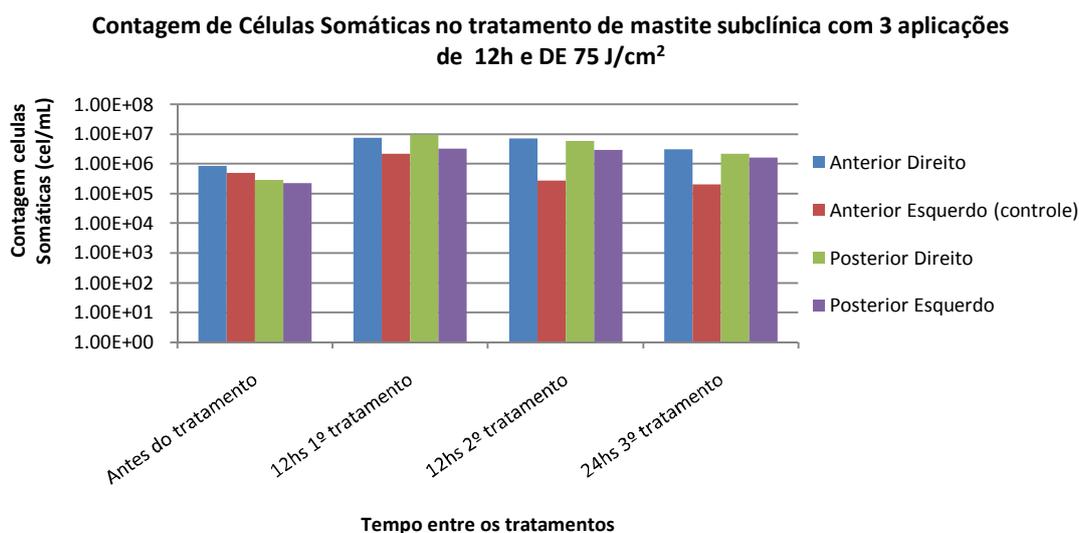


Figura 35: Contagem Células Somáticas por citometria de fluxo, do leite dos animais em tratamento de mastite subclínica com a densidade de energia 75J/cm² e intervalo de 12h entre as aplicações.

Após as análises dos resultados obtidos na CCS foi realizado tratamento estatístico por ANOVA em todos os intervalos de tempo do tratamento (48h, 24h e 12h) com o intervalo de confiança de 5%. Observou-se que as DE 50J/cm² no intervalo de 48h entre os tratamentos e DE 75J/cm² com intervalo de 12h não apresentaram diferenças significativas ($f_{cal} < f_{tab}$), $p > 0,05$. Os outros resultados para CCS foram significativos nas diferentes DE utilizadas no experimento *in vivo*.

Constatou-se, no presente estudo, que não houve redução na quantidade de CCS com os tratamentos, mesmo quando aplicados em diferentes intervalos de tempo (48, 24 e 12h) e em diferentes densidades de energia testadas. Este fato pode ter ocorrido, primeiramente, por ter modificado o manejo dos animais tratados, já que foi constatado que poucas alterações no manejo do rebanho representavam um aumento de celularidade de células somáticas detectadas pelo exame CMT, confirmando os estudos de SCHUTZ et al., (1990) e LAEVENS (1997), que relataram que os fatores como, idade das vacas, estações do ano, estresse, estágios de lactação poderiam influenciar na CCS, e por RIBEIRO et al. (2003) corroborando com esses autores sugerindo maior cautela no uso deste como indicativo de doença. Por essa razão só foram tratados os animais que apresentavam mastite subclínica com positividade ao exame CMT com grau 3+, em quatro exames seguidos, sem a modificação no manejo.

Outra possibilidade para o aumento da CCS estaria diretamente associada com o aumento da CBT durante os tratamentos, pois se a CBT não diminuísse por não ter atingido os parâmetros relatados por SOUKOS et al. (1996) em que o efeito do PDT é dependente para obter o efeito bactericida, conseqüentemente a CCS também permaneceriam elevados.

4.1.2.4. Microrganismos Isolados

Nas amostras de leite examinadas antes de cada tratamento, com intervalo de 48h entre as aplicações, foram isolados e identificados os microrganismos representados na Tabela 9.

Tabela 9: Identificação dos microrganismos isolados nas diferentes densidades de energia com intervalo de 48h entre os tratamentos.

Tratamentos	Microrganismos								
	CONTROLE	Dose 25J/cm ²		Dose 50J/cm ²		Dose 75J/cm ²		Dose 100J/cm ²	
		Animal 1	Animal 2	Animal 1	Animal 2	Animal 1	Animal 2	Animal 1	Animal 2
Antes	Negativo	ECN	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	ECN	ECN	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
48 h após 1° tratamento	Negativo	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Klebsiella</i>	ECN	ECN	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
48 h após 2° tratamento	Negativo	Negativo	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Klebsiella</i>	ECN	ECN	Negativo	Negativo	Negativo

Pela análise desses resultados observou-se que DE 25 e 75J/cm² apresentou efeito deletérico bacteriano para o microrganismo *Staphylococcus* coagulase positivo isolado em amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica. Esses resultados corroboram com os encontrados por MÜLLER et al. (2006) que avaliaram a ação antimicrobiana do PDT, no combate ao *Staphylococcus aureus*, em um estudo comparativo entre os fotossensibilizantes, azul de metileno (0,01%) e alumínio ftalocianina tetrasulfonada (35µM). Os autores concluíram que a densidade de energia 4,5J/cm² por 5 minutos na utilização do PDT *in vitro*, apresentou efeito deletérico para a bactéria e sugeriram que o tratamento poderia ser uma alternativa para uma terapia antibiótica tópica com o fotossensibilizante azul de metileno (0,01%), mas que deveria ainda provar a eficácia para inativação de bactérias *in vivo*, que foi a proposta de estudo no presente trabalho confirmando a sua eficácia para as DE 25 e 75J/cm².

Ao utilizar a DE 50 J/cm² ocorreu o isolamento de *Klebsiella* sp., microrganismo oportunista que poderia ter sido beneficiado pela diminuição do crescimento de *Bacillus* spp., microrganismo este inicialmente causador da mastite subclínica, no teto infectado antes do tratamento, pois observou-se, com os resultados apresentados da Tabela 9, que a DE 100J/cm² foi capaz de eliminar *Bacillus* spp. em todos os tetos infectados estudados.

SOUKOS et al. (1998) relataram em sua pesquisa, que o efeito deletérico do PDT contra microrganismos bacterianos pode assumir uma variação considerável devido ao FS usado, estabelecendo que, para organismos gram-positivos, tanto FS carregados positivamente como carregados negativamente são efetivos para mediar o PDT, confirmando as pesquisas de DAS et al. (2001) onde uma maior ou menor eliminação bacteriana será determinada pelas características da superfície bacteriana quanto à penetração do FS nas bactérias, dados que poderiam ter ocorrido no trabalho proposto com o microrganismo *Estafilococos* coagulase negativos (ECNs), que não foi eliminado quando se utilizou DE 50J/cm² e 75J/cm² no intervalo de 48h entre os tratamentos, demonstrado na Tabela 9.

Para o tratamento com intervalo de 24 horas entre as aplicações utilizando DE 75 J/cm² foram isolados os microrganismos conforme representados na Tabela 10.

Tabela 10: Identificação dos microrganismos isolados na densidade de energia de 75 J/cm² com tratamento de 24/24 horas.

ANIMAL 1 (75J/cm² tratamento 24/24 horas)				
	Anterior Direito (controle)	Anterior Esquerdo	Posterior Direito	Posterior Esquerdo
Tratamentos	Microrg	Microrg	Microrg	Microrg
Antes	Negativo	ECN	ECN	ECN
24h após 1º tratamento	Negativo	ECN	Negativo	Negativo
24h após 2º tratamento	Negativo	Negativo	ECN	ECN
24h após 3º tratamento	Negativo	ECN	ECN	ECN

Legenda: Antes=amostra colhida antes do tratamento, ECN=Estafilococos coagulase negativos, Negativo= isolamento negativo para microorganismos em aerobiose e microaerofilia.

Ao analisar os resultados constatou-se que a DE 75J/cm² foi capaz de desencadear a reação deletérica no microrganismo Estafilococos coagulase negativos (ECN) até 24h após o tratamento, ocorrendo, neste intervalo de tempo, uma ordenha em que o animal poderia se recontaminar com os utensílios e manuseio dos ordenhadores.

Para o tratamento com intervalo de 12 horas entre as aplicações foram isolados os microrganismos conforme apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Identificação dos microrganismos isolados na densidade de energia de 75 J/cm² com tratamento de 12/12 horas.

ANIMAL 2 (75J/cm² com tratamento 12/12 horas)				
	Anterior Direito	Anterior Esquerdo (controle)	Posterior Direito	Posterior Esquerdo
Tratamentos	Microrg	Microrg	Microrg	Microrg
Antes	ECN	Negativo	ECN	ECN
12h após 1º tratamento	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12h após 2º tratamento	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	Negativo	Negativo	ECN
24h após 3º tratamento	Negativo	Negativo	ECN	ECN

Legenda: Antes=amostra colhida antes do tratamento, ECN=Estafilococos coagulase negativos, Negativo= isolamento negativo para microorganismos em aerobiose e microaerofilia.

Com os resultados obtidos, utilizando a DE 75J/cm², foi observado que o intervalo de tempo de 12h entre os tratamentos foi capaz de eliminar o microrganismo Estafilococos coagulase negativo (ECN) em alguns tetos infectados, não ocorrendo a recontaminação, mesmo quando transcorrido 24h após o primeiro tratamento de irradiação. Apenas um teto tratado que apresentava ECN ao eliminar o microrganismo, 24h após o tratamento, apresentou a infecção por *Staphylococcus* coagulase positivo que também foi eliminado quando colhidos os exames 24h após o tratamento.

Ao compararmos as tabelas 10 e 11 com o intervalo de 24 e 12h entre tratamentos utilizando DE 75J/cm², os ECNs foram eliminados em dois tetos, porém, eles reaparecem em isolamentos após 48h em um quarto mamário, sugerindo uma recontaminação no intervalo do tratamento, posto que o período de incubação *in vitro* para este microrganismo é de 24 e 48h, segundo SCHALM et al. (1971). Assim, explicam-se também os dados expostos da tabela 9 com a DE 75J/cm² quando isolou-se ECNs que aparentemente não apresentou efeito deletérico quando os tratamentos consistiram em aplicações com o intervalo de 48h, podendo ter ocorrido uma recontaminação do teto tratado.

4.1.2.5. Experimento *In Vitro*, em leite mastítico, com Densidade de Energia de 200 J/cm² em três níveis e uma única aplicação com diferentes concentrações do agente fotossensibilizante

4.1.2.5.1 Contagem de Bacteriana Total (CBT)

Foram realizados experimentos com a densidade de energia (DE) de 200 J/cm² para o tratamento, com o objetivo de avaliar a eficácia do mesmo com apenas uma única aplicação. Nos experimentos realizados anteriormente não foi possível observar uma concordância entre os resultados de CBT por citometria de fluxo e o isolamento microbiano em placa. Foi necessária a realização de novo experimento, para comparar os dois métodos de contagem bacteriana total, em placa e citometria de fluxo, estando o resultado da contagem bacteriana total representada pela Figura 36.

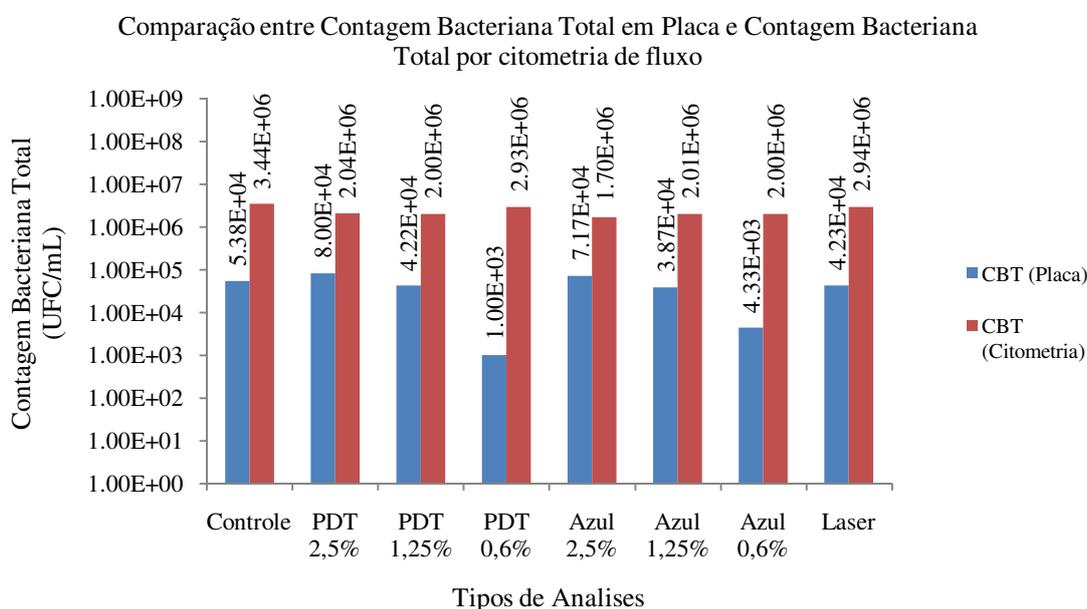


Figura 36: Comparação entre os dois métodos de contagem bacteriana, placa e citometria de fluxo, *in vitro* utilizando densidade de energia 200J/cm² e em diferentes concentrações do agente fotossensibilizante.

Após as análises dos resultados obtidos na CBT, foi realizado tratamento estatístico por ANOVA em todos os grupos de tratamento estudados *in vitro*, com o intervalo de confiança de 5%. Pela análise dos resultados, observou-se que não houve diferença significativa ($F_{calc} < F_{tab} 5\%$, $p > 0,05\%$) entre as análises de CBT para placa e citometria de fluxo nos grupos estudados.

Notou-se deste ensaio *in vitro* uma discrepância entre as técnicas para a contagem bacteriana em placas e citometria de fluxo quando se compararam os resultados. Esta discrepância pode ser proveniente da metodologia empregada para a leitura nos aparelhos de citometria de fluxo para CBT, pois CASSOLI (2005) relatou que a técnica de citometria de fluxo consiste na adição de brometo de etídio e azidiol, corante específico para DNA e RNA, ao leite para que o DNA e RNA das bactérias sejam coradas. Assim, o leite com o corante é injetado num capilar acoplado a um sistema óptico, que recebe constantemente um feixe de laser. Ao passar por este feixe, cada bactéria emite uma fluorescência, a qual é captada pelo

sistema óptico (BARRIENTOS, et al., 2000; BROUTIN, 2004; GUNASEKERA et al., 2000; SUHREN et al., 1999), determinando o número de bactérias expressado em contagem individual de bactérias (CID).

O limite legal para o CBT previsto na IN-51 foi estabelecido em Unidade Formadora de Colônia (UFC) e este fato implicou a necessidade de se desenvolver uma equação de correlação entre os métodos de contagem bacteriana em placa e de citometria de fluxo, para que os resultados expressos em CID foram transformados em UFC. No entanto, observou-se que houve excesso de corante nas amostras, FS azul de toluidina com o corante utilizado pelo laboratório oficial, pois o experimento foi realizado *in vitro*, utilizando diferentes diluições do FS, em que ambos são de coloração azul com absorção no comprimento de onda de 620nm, que poderia ter influenciado nos resultados dos exames.

4.1.2.5.2. Contagem de Células Somáticas (CCS)

Avaliou-se no ensaio *in vitro*, utilizando DE 200J/cm² com uma única aplicação, diferentes concentrações do agente fotossensibilizante azul de toluidina e sua influência na contagem de células somáticas (CCS) por citometria de fluxo. Os resultados obtidos estão representados na Figura 37, os valores da Contagem de Células Somáticas em diferentes concentrações do agente fotossensibilizante, azul de toluidina.

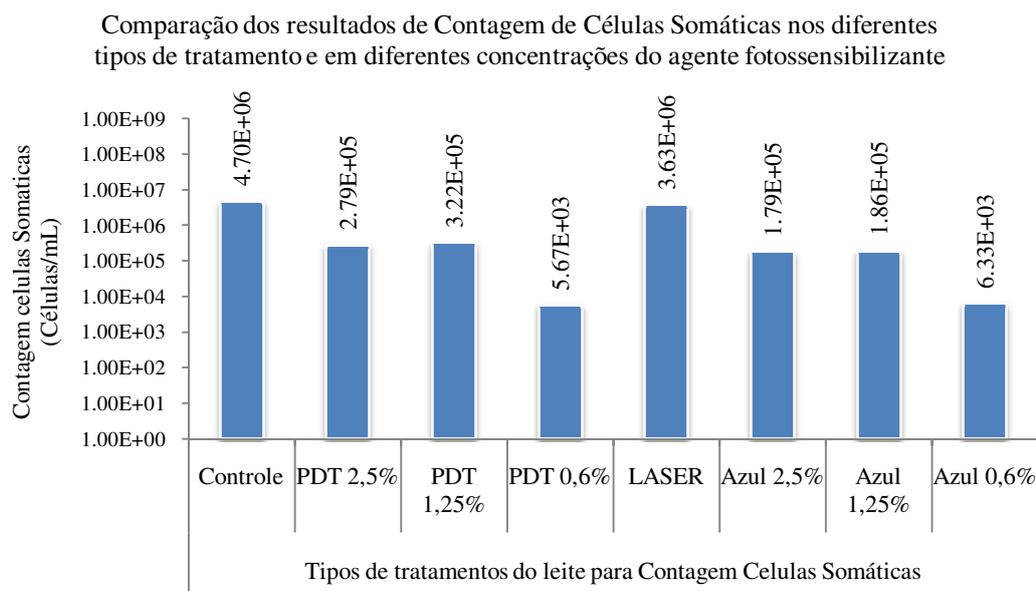


Figura 37: Comparação dos resultados *in vitro* utilizando densidade de energia 200J/cm² em diferentes concentrações do agente fotossensibilizante para a Contagem de Células Somáticas (CCS).

Após as análises dos resultados obtidos na CCS foi realizado tratamento estatístico por ANOVA em todos os grupos de tratamento estudados *in vitro*, com o intervalo de confiança de 5%. Observou-se pela análise dos resultados obtidos que não houve diferença significativa ($F_{calc} < F_{tab} 5\%$, $p > 0,05\%$) entre as análises de CCS para citometria de fluxo dos grupos estudados.

CASSOLI (2005) relatou em seu trabalho que há a necessidade de realizar tratamentos com enzimas proteolíticas para eliminar as proteínas com detergente para a remoção da gordura do leite. Estas enzimas atuam na degradação das células somáticas podendo ser destruídas. Neste estudo constatou-se que, ao utilizar a menor concentração do agente

fotossensibilizante, obteve-se a menor contagem de células somáticas por mL, tanto no grupo PDT a 0,6% como no grupo Azul 0,6%, sugerindo que as amostras tenham sido degradadas durante o processo automatizado ou que o corante azul de toluidina interferiu na leitura dos exames realizados por citometria de fluxo.

4.1.2.5.3 Microorganismos Isolados

Neste experimento foram isolados os microrganismos conforme representados na Tabela 12, em que todas as seis amostras de leite mastítico participaram de vários ensaios.

Tabela 12: Isolamento dos microrganismos em várias amostras em grupos de tratamentos distintos utilizando várias concentrações do agente fotossensibilizante.

Amostras	Controle	PDT 2,5%	PDT 1,25%	PDT 0,6%	LASER	AZUL 2,5%	AZUL 1,25%	AZUL 0,6%
1	ECN	-	Negativo	Negativo	Negativo	-	Negativo	Negativo
2	ECN	-	Negativo	Negativo	ECN	-	Negativo	ECN
3	Negativo	-	Negativo	Negativo	Negativo	-	Negativo	Negativo
4	ECN	ECN	ECN	-	ECN	ECN	ECN	-
5	ECN	ECN	ECN	-	ECN	ECN	ECN	-
6	ECN	ECN	ECN	-	ECN	ECN	ECN	-

Legenda: Negativo= negativo para germes aeróbios e microaerofilia, ECN=Estafilococos coagulase negativos, - =amostra não realizada.

Com os resultados obtidos no isolamento microbiano do presente ensaio *in vitro* pode-se corroborar com as investigações de STRIGER et al. (1998) que utilizaram luz policromática em combinação com vários FS e relataram que o corante azul de toluidina poderia causar efeito deletérico em bactérias quando estudadas *in vitro*, e por MÜLLER et al. (2006) que constataram a ação do PDT no combate ao *Staphylococcus aureus* em um estudo comparativo entre os fotossensibilizantes. Os autores concluíram que o PDT tem boa funcionalidade como alternativa para uma terapia antibiótica tópica, mas que somente uma experimentação clínica controlada e minuciosa poderia provar a eficácia para inativação de bactérias *in vivo*, posto que, observaram uma atividade antimicrobiana quando se utilizou apenas o FS estudado *in vitro*, dados também encontrados no presente trabalho.

4.2. Parte II- Resultado do Tratamento da Mastite Subclínica através da Terapia Fotodinâmica (PDT)

4.2.1 Contagem Bacteriana Total dos animais tratados com mastite subclínica através do PDT.

Os resultados do tratamento da mastite subclínica, empregando o método de PDT *in vivo* utilizando a DE 200J/cm² com uma única aplicação em três níveis de profundidade, foram obtidos para a CBT estão representados na Figura 38.

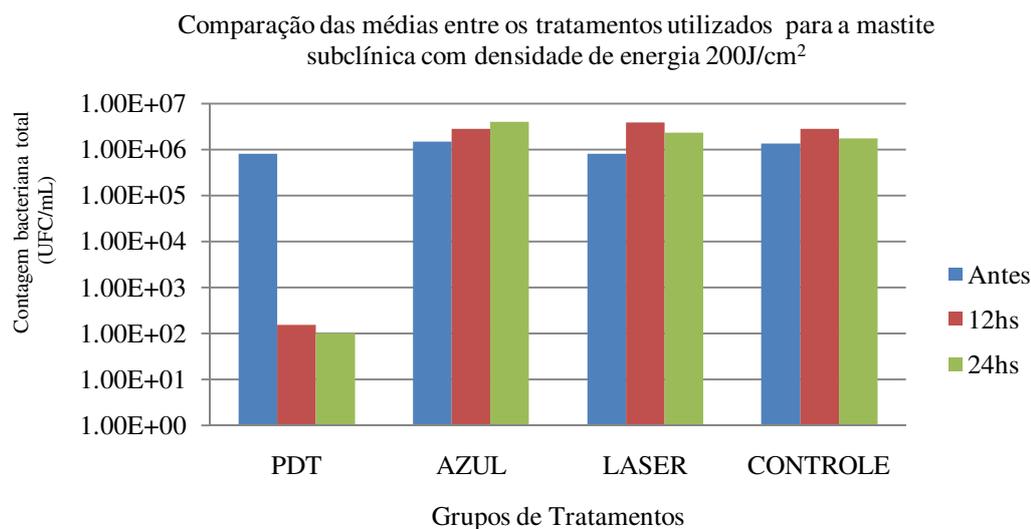


Figura 38: Comparação das médias entre os tratamentos utilizados para a mastite subclínica, utilizando densidade de energia 200J/cm² *in vivo*.

Após as análises dos resultados obtidos na CBT por placa, foi realizado tratamento estatístico por ANOVA em todos os grupos do tratamento, com o intervalo de confiança de 5%. O tratamento com o grupo 1 (PDT) foi o único que apresentou diferença significativa ($f_{cal.} = 2,80 > f_{tab} 2,39$), $p < 0,05$, caracterizando que o tratamento foi eficiente na redução parcial ou eliminação dos microrganismos envolvidos na contagem bacteriana total para mastite subclínica.

Com este resultado obtido, confirmam-se os relatos de VENEZIO et al. (1985) que investigaram a ação do PDT, utilizando hematoporfirina como corante fotossensível, e obtiveram, como resultado, o efeito bactericida de 99,9% em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus M-G intermediaris*, *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus magnus* e *Clostridium perfringens*.

OKAMOTO et al. (1990); OKAMOTO et al. (1992), investigaram o efeito bactericida do laser HeNe em microrganismos cariogênicos. Os autores concluíram que a ação bactericida foi determinada pela formação de uma inibição do crescimento de colônias bacterianas viáveis como *Streptococcus sobrinus* e *Echerichia coli*, dados também confirmados por SANKAR (1987) quando verificaram a ação do PDT obtendo-se efeito deletérico em 91,1% das bactérias aeróbicas sensibilizadas e 96,6% em bactérias anaeróbias, e por BURNS et al. (1992) ao utilizarem o PDT com LEDs associado com azul de toluidina, obtendo, como resultado, a eliminação de bactérias cariogênicas como, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum*. Assim, podemos inferir que o PDT utilizando LEDs com corante fotossensível azul de toluidina a 2,5%, apresentou efeito bactericida quando utilizou DE 200J/cm² em três níveis de profundidade, corroborando com os autores acima citados.

Essa eficácia da morte bacteriana promovida pelos FS utilizados no PDT confirmou-se como sendo significativamente diferente entre as bactérias gram positivas e gram negativas, com maior eficácia contra as bactérias gram positivas, pois as gram negativas apresentam a membrana externa (bicamada lipídica) fora da camada de peptídeoglicano, dificultando a penetração como os relatos de MERCHAT et al. (2001), dados também confirmados no presente estudo ao utilizar o PDT e obter as bactérias Gram positivas e negativas encontradas em amostras de leite nos animais tratados com mastite subclínica.

Com a elaboração da ponteira de acrílico irradiando a região interna do teto infectado pela mastite subclínica, o presente estudo não corrobora com os estudos encontrados por STOFFEL et al. (1989) quando estudaram o efeito da irradiação LEDs (HeNe) na glândula mamária bovina acometida pela mastite subclínica, irradiando 25 mW em uma área de 7,5 cm de diâmetro na epiderme do teto infectado por um período de 30 minutos diariamente, durante cinco dias consecutivos.

Os autores relataram que não houve evidências de qualquer estimulação da glândula mamária com mastite subclínica na utilização do LEDs quando aplicado diretamente na epiderme; não ocorrendo também possíveis alterações nos parâmetros avaliados no leite - tão somente aqueles decorrentes da mastite subclínica. No estudo em pauta não foram verificadas alterações na composição do leite em decorrência ao tratamento intramamário porque a intenção foi a de eliminar as bactérias causadoras de mastite subclínica com um agente fotossensibilizante (FS) que não deixasse resíduos no leite após a sua aplicação, mesmo sendo um tratamento tópico como sugere MÜLLER et al. (2006) para a realização de tratamento *in vivo* para demonstrar a eficácia do tratamento antibacteriano.

Há poucos trabalhos publicados relacionando mastite com tratamento a laser. Ao comparar os trabalhos de SKOBELKIN et al. (1984), ALEKSEENKO et al. (1987) e DOTSENKO et al. (1989) no tratamento de mastite aguda em mulheres durante a lactação, verificaram, os autores, apenas os mecanismos fisiológicos estimulados, para processos inflamatórios, analgésicos e reparação tecidual, quando irradiados diretamente na glândula mamária, em toda a sua extensão e mamilos, relatando que mulheres após a irradiação se recuperaram mais rapidamente do que o grupo controle tratado convencionalmente - dados não avaliados no presente estudo.

Com os resultados obtidos no grupo 2 (Azul) em relação à contagem bacteriana total discordamos com os descritos por MÜLLER et al. (2006) e SOUKOS et al. (1998) que relataram a ação antimicrobiana, em um estudo comparativo entre os fotossensibilizantes. Os autores concluíram que quando se utilizou somente o corante azul de toluidina em amostras *in vitro* houve efeito deletérico nas bactérias estudadas e este efeito deletérico não foi observado quando trataram vacas com mastite subclínica (*in vivo*) caracterizando que microrganismos utilizados em ensaios *in vitro* apresentam um comportamento diferente quando estudados *in vivo*.

SIBATA (2000) relatou o mecanismo de ação do PDT caracterizando três tipos de reação (I, II, III) quando a região de interesse é irradiada com luz de comprimento de onda específico excitando o FS obtendo como resultado os efeitos fotoquímicos que são deletéricos para as bactérias. Com os resultados obtidos do Grupo 2 do presente trabalho podemos afirmar que este efeito fotoquímico não ocorreu quando apenas aplicou o FS, azul de toluidina 2,5%, no teto infectado por mastite subclínica, devendo-se ter cautela nos ensaios realizados *in vitro* em que observou-se efeito deletérico para as bactérias como os estudos de MÜLLER et al. (2006) e SOUKOS et al. (1998).

Observou-se, pelos resultados obtidos na contagem bacteriana total do Grupo 3 (LASER) em que os tetos infectados foram apenas tratados com a irradiação de DE 200J/cm². Notou-se que não houve diferença significativa neste grupo, antes e após o tratamento (12 e 24h).

RIGAU (1996) descreveu que todo laser LED é responsável por produzir os efeitos fotoquímicos e fotofísicos, em que o princípio básico consiste, no processo fotoquímico o comprimento de onda específico da radiação é absorvido por cromóforos naturais que são capazes de estimular certas reações bioquímicas em nível celular como a bioestimulação.

MÜLLER et al. (2006) observou as colônias que foram irradiadas com apenas laser, e relataram que não houve efeito antimicrobiano, mas atividade bioestimulatória, com uma

contagem bacteriana até 3,1% acima do valor obtido pelo controle, valores que não são confirmados com o presente estudo.

Pode-se dizer com os resultados do Grupo 3 (Laser) que a DE 200J/cm², quando aplicado *in vivo*, não foi suficiente para que ocorresse a bioestimulação microbiana como nos relatos encontrados por MÜLLER et al. (2006), portanto, não se pode confirmar se ocorreu o efeito fotoquímico nos microrganismos encontrados neste grupo causador de mastite subclínica, não corroborando com os estudos de RIGAU (1996).

Nos resultados de contagem bacteriana total obtida no grupo 4 (controle) não houve diferença significativa entre os intervalos de colheita das amostras seguindo a mesma metodologia dos outros grupos relacionados no texto (PDT, azul, laser).

Os isolamentos dos agentes causadores da mastite subclínica estão representados na Tabela 13.

Tabela 13: Número de microorganismos isolados nos seus respectivos grupos de tratamentos em todas as fases.

Microorganismos	PDT			LASER			AZUL 2,5%			CONTROLE		
	Inicial	12 h	24h	Inicial	12 h	24h	Inicial	12 h	24h	Inicial	12 h	24h
<i>Estafilococcus coagulase negativos</i>	3	1	2	6	7	7	10	9	6	3	4	5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	6	7	6	1	1	1	1	1	1	3	3	2
<i>Streptococcus bovis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Bacillus sp</i>	0	0	0	5	5	3	1	1	2	1	2	2
<i>Corynebacterium sp</i>	0	0	1	1	1	1	2	3	2	3	4	4

Os resultados obtidos no isolamento microbiano corroboram com os dados de BHATTI et al. (1998) e HAMBLIN et al. (2002) que demonstraram evidências que os FS que penetram no interior da bactéria podem ser mais efetivos que aqueles que agem na superfície bacteriana. Este dado não significa que os FS que agem na superfície bacteriana não são eficazes, mas sim apenas mais difíceis de serem eliminados como no caso de *E. coli* e os microrganismos ambientais que apresentam uma maior resistência natural, conforme observados no trabalho em pauta.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a metodologia utilizada foi eficiente para eliminar a maioria dos patógenos causadores de mastite subclínica nos animais. Entretanto, há necessidade de futuras investigações para aprimoramento desta técnica que, quando associada ao correto manejo zoonosológico, certamente será de grande utilidade no tratamento das mastites, minimizando os prejuízos da produção leiteira, diminuindo o tempo de tratamento e evitando problemas com resíduos de antibióticos.

4.2.2. Resultados Histopatológicos

No animal de matadouro tratado 24h antes do abate, observou-se que o teto não tratado utilizado como controle apresentava mastite subclínica crônica com os alvéolos contendo secreções no interior com frequentes polimorfonucleares e presença de calcificações. Nos ductos excretórios observaram-se epitélio atípico, epitélio folicular variando de cúbico baixo a cúbico alto com células vacuolizadas e grande número de células mononucleares, caracterizando um severo processo inflamatório (figura 39 e 40).

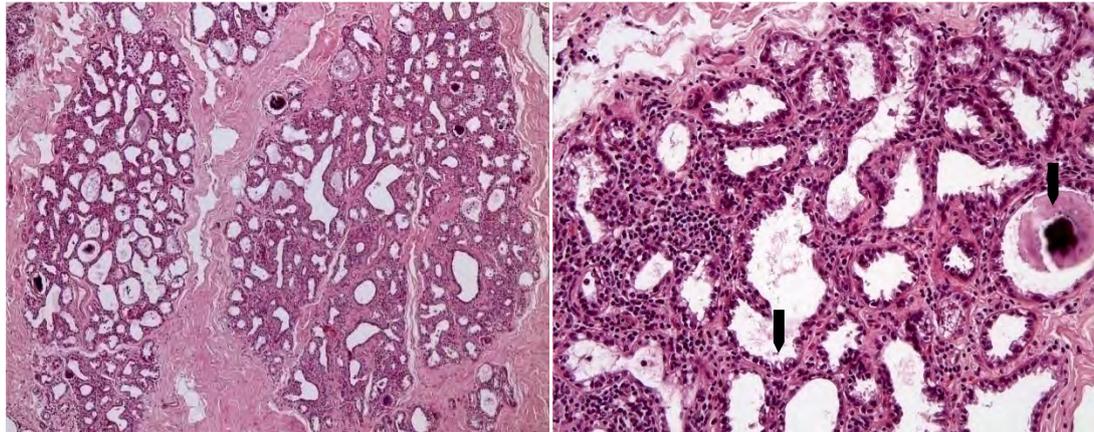


Figura 39: Corte histológico do teto controle em aumento 5x e 20x respectivamente, epitélio folicular variando de cúbico baixo a cúbico alto com células vacuolizadas e grande número de células mononucleares, caracterizando um severo processo inflamatório.

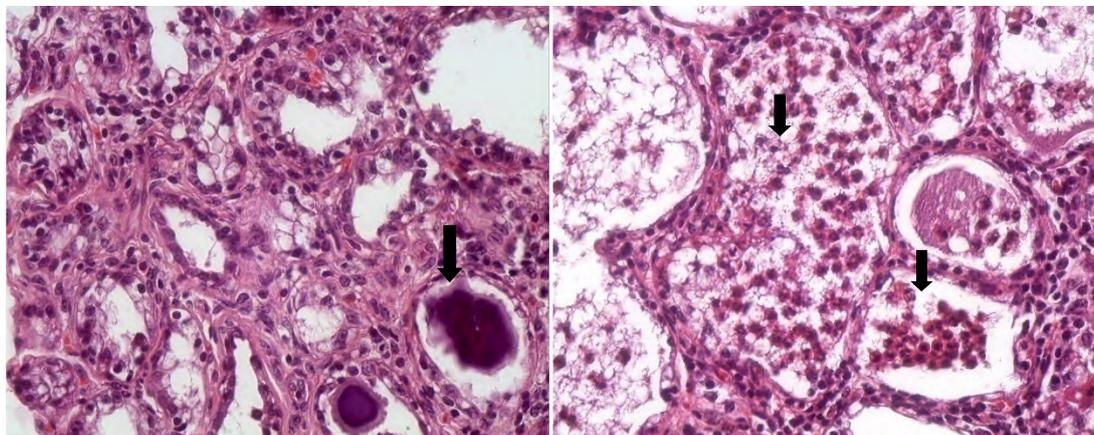


Figura 40: Corte histológico do teto controle em aumento 40x, alvéolos contendo secreções no interior com frequentes polimorfonucleares e presença de calcificações.

No teto tratado foram observados alvéolos com secreções, mas sem a presença ou poucos polimorfonucleares e alvéolos revestidos de células cubóides uniformemente distribuídos com pequeno número de calcificações (figura 41 e 42).

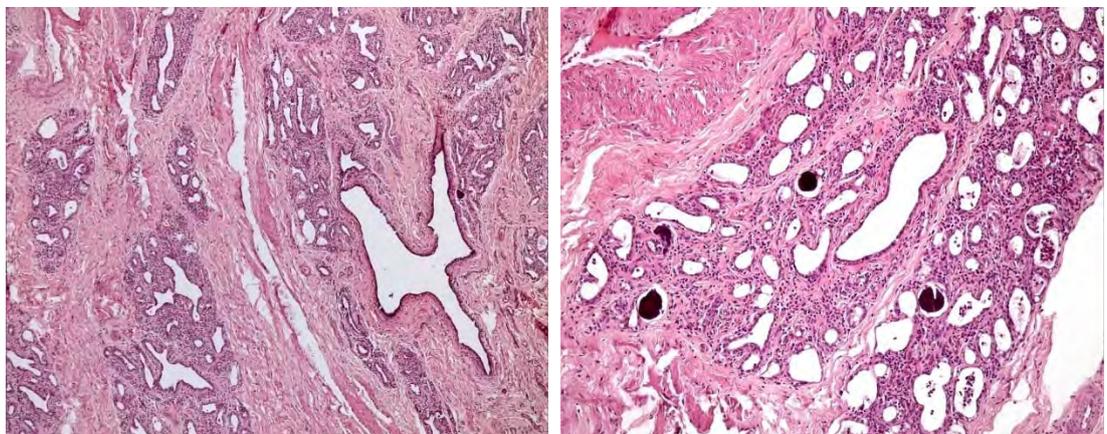


Figura 41: Corte histológico do teto tratado que receberam densidade de energia $200\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 5x e 10x respectivamente, alvéolos com secreções, mas sem a presença ou de poucos polimorfonucleares, revestidos de células cubóides uniformemente distribuídos com pequeno número de calcificações.

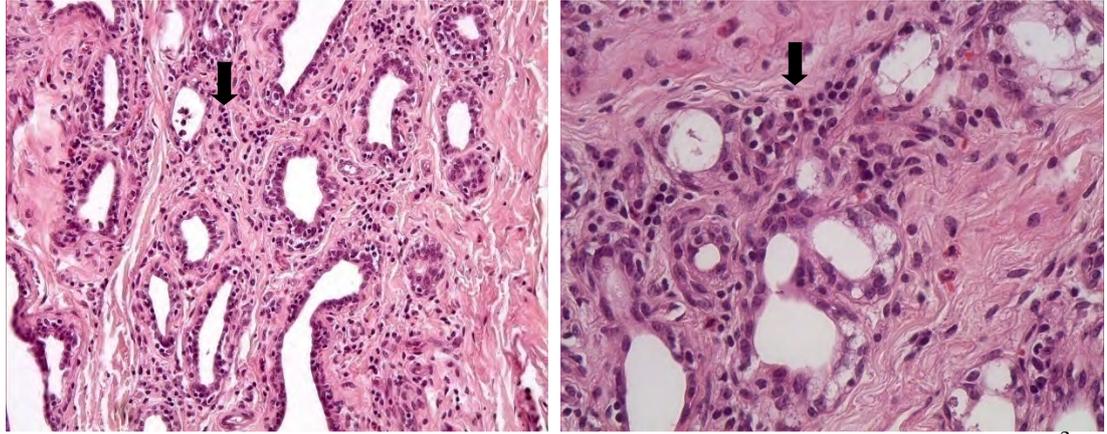


Figura 42: Corte histológico do teto tratado que recebeu densidade de energia $200\text{J}/\text{cm}^2$ em aumento 20x e 40x respectivamente, caracterizando um processo inflamatório severo para moderado em 24h após o tratamento.

Quando se compara os quartos mamários, tratado e controle, observamos que as calcificações no teto tratado também são frequentes, porém menos numerosas do que no teto controle, caracterizando um processo inflamatório moderado em relação ao outro teto com um processo inflamatório crônico. Como nos exames de CMT de ambas, os tetos deram positividade no grau 3+, com mesma intensidade, o que pode indicar que o teto tratado após 24 horas apresentou uma melhora no seu estado geral, acarretando um aumento da microcirculação da glândula, com a diminuição do número de polimorfonucleares encontrados na secreção alveolar e no estroma, passando de um processo inflamatório severo para moderado, e não se constataram alterações no epitélio da glândula mamária decorrentes ao uso da Terapia Fotodinâmica (PDT) em decorrência do mecanismo de ação descrito por GONÇALVES et al. (2005).

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- ❖ A terapia fotodinâmica, utilizando a densidade de energia (DE) 200 J/cm² com uma aplicação para tratar mastite subclínica foi eficiente, demonstrando significativa diminuição da infecção nos quartos mamários tratados, caracterizada pela redução na contagem bacteriana total de *Streptococcus dysgalactiae*, assim como as DE utilizadas de 25 J/cm², 75 J/cm², 100 J/cm² com três aplicações foram eficientes para eliminar *Staphylococcus* coagulase positivos, *Estafilococos* coagulase negativos, *Bacillus* spp., respectivamente, isolados de tetos com mastite subclínica;
- ❖ As adaptações para a adequação dos aparelhos LEDs para tratamento dos tetos afetados por mastite subclínica em bovinos foi eficiente, permitindo que a irradiação atingisse o interior do quarto mamário tratado;
- ❖ O agente fotossensibilizante azul de toluidina a 2,5% foi capaz de desencadear o efeito desejado, permitir a dispersão da luz e estimular resposta microbiana o que promoveu a eliminação dos microrganismos isolados;
- ❖ Não se observaram lesões anátomopatológicas e histológicas no epitélio da glândula mamária no animal tratado provenientes do uso da Terapia Fotodinâmica (PDT) com azul de toluidina a 2,5%;
- ❖ Não houve redução da Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem Células Somáticas (CCS) analisadas pelo método de citometria de fluxo, sugerindo ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a realizar novas calibrações nos equipamentos, adequando-os a uma abrangência nacional.
- ❖ Mesmo que os resultados do presente trabalho tenha sido significativos, há necessidade de futuras pesquisas, para aperfeiçoamento da técnica que, certamente, será uma metodologia alternativa de grande valor para tratamento das mastites.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNES, R.; ESTIMA, B.; LADEIRA, S.; MARTINS, L.; SANTIAGO, V. Mastite e Brucelose na Bacia Leiteira de Rio Grande, RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1995, Santos. **Resumo Congresso Brasileiro de Microbiologia**, p.12-15, 1995.

ALEKSEENKO, A.V.; PALIANITSA, S.I.; TARABANCHUK V.V., SENIUTOVICH, R.V.; STOLIAR, V.F. Treatment of suppurative mastitis using laser irradiation and continuous electric current, **Vestn Khir Im I I Grek.**, v.139, n.10, p.54-7 1987.

BARRIENTOS, A.A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; NOMBELA, C. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p. 167-195, 2000.

BEVILACQUA, I.M.; JUNIOR, A. B. & NICOLAU, R.A.. Ação do LASER de baixa potência associado à substâncias fotoativadoras na redução de cândidas em meio bucal (revisão de literatura). **IX Encontro Latino Americano de Iniciação científica e V Encontro Latino Americano de Pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba**, p.1925-1928, 2006.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B. & WILSON, M.. A study of the uptake of toluidine blue O by porphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiology**, v.68, p.370-6, 1998.

BLOOD, D.C.; RADOSTITIS, O.M. **Clínica Veterinária**. 7ªed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1350p., 1989.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, p.13, 21 de setembro de 2002.

BRASIL. Instrução Normativa nº 59, 04 de novembro de 2002. Laboratório em referência em análises. **Métodos Analíticos oficiais para controle de produtores de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, p.26, 2002.

BRITO, M.A.V.P., **Conceitos básicos de qualidade e sanidade do gado leiteiro**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 5p., 1999.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 26p., 1999 (Embrapa Gado de Leite, Circular Técnica, 55)

BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo de qualidade. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso da qualidade do leite no Brasil**, Passo Fundo, Editora UFP, cap.26, p.317-333, 2004.

BRUGNERA, J.A.; PINHEIRO, A.L.B.; **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 220p., 1999.

BURAGOHAIN, J.; DUTTA, G.N. Increased milk yield through treatment of bovine subclinical mastitis and its economic implications. **Indian Journal Animal Science**, v.60, p.965-966, 1990.

BURNS, H. A. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **Journal Dent.**, n. 22, p. 273-278, 1992.

BUSANELLO, R. Z. **Avaliação do fracionamento de dose de energia em Terapia Fotodinâmica utilizando Poli-hematoporfirina de sódio em língua normal de ratos**, Dissertação (Mestrado) em Engenharia Biomédica, Instituto de Pesquisa e desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 80p., 2003.

CARNEIRO, A.V. **Viabilidade técnica e impacto econômico da erradicação de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos bovinos**. Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária. 59p. 2006.

CASSOLI, L.D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 46p., 2005.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R.; Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamikc Therapy**, v.1, p. 279-293, 2004.

CHAVANTES, M.C.; **Aplicación Del Laser em Patologias cerebrovasculares**. In: Enfermidades cerebrospiniais isquêmicas y hemorrágicas. Mendes, J.; Leiguarda, R.C. (eds). Publ. Tecn. Mediterraneo, Chile, 53, 593-599, 1990.

CHAVANTES, M.C.; JATENE, A. Uso do Laser na Área Cardiovascular. **Arquivo Brasileiro Cardiologia**, v. 54, n.1, p. 63-68, 1990.

CHAVANTE, M.C., ZAMORANO, L., VINAS, F.C.; DUJOVNY, M.; DRAGOVIC, L., Experimental in vivo study of Laser-tissue interaction on the brain: influence of gaseus environment. **Laser- Tissue Interaction**, n.1202, p.324-332, 1990.

CHAVANTES, M.C. Acute Effects of Transmyocardial Revascularization on Left Ventricular Function in Intractable-Angina. **Laser Surgical Medicine**, v.11, p.6-7, 1998.

CHERKASSKAIA,R.S; NESTEROVA, S.M.; EFENDIEV, A.I., TSEITLINA, A.I. Microbiology of suppurative wound in laser radiation. **Khirurgiia Mosk**, n.6, p.32-5, 1994.

COSTA, O C. et al. *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.5, p.117-120, 1985.

COSTA, E.O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Comunicado Científico Fac. Medicina Veterinaria Zootecnia Universidade São Paulo**, São Paulo, v. 15, n.1, p. 21-26, 1991.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, 1, 3-9p, 1998.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M. S.; SCHALCH, U. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, p.156-159, 1995a.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; VIANI, F.C.; MASCOLLI, R.; LIVEIRA, P.J. Mastite bovina: CMT *versus* microbiológico. **Hora Veterinária**, v.15, n.89, p.53-54, 1995b.

CULLOR, J.S.; TYLER, J.W.; SMITH, B.P.; Disorders of the mammary gland. In: SMITH, B.P. **Large animal internal medicine**. St. Louis: Mosby: 1044-1067, 1990.

DANIEL, M.D.; HILL, J.S.A. A history of photodynamic therapy. Aust. N. Z. **Journal Surgical**, v.61, p.340-348, 1991.

DAS, S.C.; KAPOOR, K.N.; MUKHOPADHYAY, M. Comparative evaluation of hydrophobicity measures for virulence determination of *Staphylococcus epidermidis* from hospitalized patients and healthy individuals. **Indianian Journal Medical Resource**, n.114, p.160-163, 2001.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol**. V.17, n.3, p.245-54, 2004.

DOTSENKO, A.P. DOTSENKO, A.P., CHINCHENKO, E.I. & KHODOS, V.A. Use of carbon dioxide laser in the treatment of acute lactation mastitis. **Sov Med.** , n.9, p.39-42, 1989.

DUARTE, R. S. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group streptococci recovered from bovine and human sources. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 97-103, 2002.

EDMONDSON, P.W., Estratégias para a produção de leite de alta qualidade. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., Ribeirão Preto. **Anais**. São Paulo, Instituto Fernando Costa, p.34-45, 2002.

ESCHERICH, E. **Die Darmbakterien der Säugling**. Stuttgart: Med. Hoschs, 1885.

FAGLIARI, J. J. Mastite bovina: comparação entre os resultados obtidos pelo California Mastitis Test e o exame bacteriológico. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.35, n.3, p.310-315, 1983.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 175p., 2000.

FREITAS, M.F.L.; JUNIOR, J.W.P.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S. de A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V..M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos

isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biologia**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FRITCH, C. Photodynamic therapy in dermatology. **Arch. Dermatol.**, n.134, p. 207-214, 1998.

GARCEZ, A.S.; SOUZA, F.R.; NÚNES, S.C.; KATHER, J.M.; RIBEIRO, M.S. Terapia Fotodinâmica em Odontologia – Laser de baixa potência para redução microbiana. **Revista APCD**, v.57, n.3, p.223-226, 2003.

GONÇALVES, L. **Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal**, 124f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2005.

GONZALES, R. N.; JASPER, D. E.; FARVER, T. B. Prevalence of udder infections and masties in 50 California dairy herds. **Journal American Veterinary Medicine Assoc.**, v.193, n.3, p.323-8, 1988.

GÖTZE, R. Zur klinischen Diagnostik und Behandlung der Kokkenerkrankungen des Euters. **Berlin Tierärztliche Wochenschrift**, n.40, p.649-656, 1931.

GREGORY, L.; BIRGEL, E.H.; HOEDEMAKER, M. & GRUNET, E.. Mastite dos bovinos: histórico de suas formas clínicas. **Continuous Education Journal CRMV-SP**, v. 4, n.3, p.31-38, 2001.

GUNASEKERA, T.S.; ATTFIELD, P.V.; VEAL, D.A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1228-1232, 2000.

HAMBLIN, M.R.; O'DONNELL, D.A.; MURTHY, N. RAJAGOPALAN, K.; MICHAUD, N.; SHERWOOD, M.E. & HASAN, T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. **Journal Antimicrobiology Chemother**, v.49, p.941-51, 2002.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.

HARROP, M. H. V. et al. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do Agreste Meridional de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira série Veterinária**, v. 10, p.65-67, 1975.

HAUBNER, G.C. Die inneren und äußeren Krankheiten der landwirtschaftlichen Haussäugetiere. 5. Aufl. **Anclam: Dietze**, p.392-395, 1867.

HAYATA, Y. Fiberoptic Bronchoscopic Laser Photoradiation for Tumor Localization in Lung Cancer. **Chest.**, v.82, p.10-14, 1988.

HESS, E.; **Erkrankungen des Euters**. Braumuller: Wien & Leipzig, p.25-192, 1911.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Bovine Mastitis**. In: Animal Pharma Bruxelas: V & O Publication, p. 1-53, 1987.

JACQUES, S.L. Absorption coefficients different wavelength. **Biology research Laboratory of University of Texas**. M. D. Anderson Cancer Center, 1995.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near – IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, p.1-17, 1999.

KARU, T.I.; PYTIBRAT, L. & KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, n.27, p.219-223, 1995.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 1, p.167-188,1981.

KITT, L.; GLACE, F. Die Milchdrusen. In: KITT, L. (Hrsg.): **Ellenbergers Handbuch der vergleichenden Histologie und Physiologie der Haussaugetiere**, Wien: von Moritz Perles, p. 337-394, 1908.

KOVALEV, M.I. Prevention of lactation mastitis by the use of low-intensity laser irradiation. **Akush Ginekol (Mosk)**. v.2, p.57-61, 1990.

LAEVENS, H. Influence of Parity and Lactation Stage on the Somatic Cell Count in Bacteriologically negative dairy cows. **Journal Dairy Science**, Savoy, v. 80, p.3219-3226, 1997.

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; SALVADOR, R. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1027-1032, 2001.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. Etiologia e tratamento das mastites bovinas com auxílio do dimetilsulfóxido (DMSO). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1984.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1990.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista Educação Contemporânea. Crmv. SP**, São Paulo, v.3, n.3, p.57-64. 2000.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A. O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Revista Nappama**, n.1, p.4-7, 2000.

- MARTINS, L.; CARDOSO, C. M.; SANTIAGO, V.; LADEIRA, S. Agentes causadores de mastite em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1995, Santos. **Resumos...** Santos, p.129, 1995.
- MERCHAT, M.; SPIKES, J.D.; BERTOLINI, G.; JORI, G. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. **Curr Microbiology**, n.42, p.408-14, 2001.
- MÜLLER, E. E. Profilaxia e controle da mastite bovina. In: Encontro de Pesquisadores em mastite, III, 1999, Botucatu-SP. **Anais...**, Botucatu-SP, p. 57-61, 1999.
- MÜLLER, F., OLIVEIRA, V.C.; OLIVEIRA, A. L. & SILVA, N.S. Ação antimicrobiana da PDT no combate ao *Staphylococcus aureus*: um estudo comparativo entre fotossensibilizantes. X encontro Latino Americano de Iniciação científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, p.2151-2155, 2006.
- MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v.20, n.3, p.606-611, 2000.
- NADER FILHO, A; SCHOKEM. R.P.I.; ROSSI JÚNIOR, A.D.; CEMBRANELLI, E. M.. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, N.5, P.3-6, 1985.
- NICKERSON, S. C. Estratégias para controlar a mastite bovina. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, 1, 1998, Curitiba-PR, **Anais...**, Curitiba-PR, p.20-27, 1998.
- NICKERSON, S.C.; OWENS, W.D.; BODDIE, R.L. Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control. **Journal of Dairy Science**, v.78, p. 1607-1618, 1995.
- NICOLA, J.H. The role of polarization and coherence laser light on wound healing. **Laser Tissue Interaction**, p.448-450, 1994.
- NOCARD, P.; MOLLEREAU, R. *Sur la mammité contagieuse*. Paris: Masson, p.817-831, 1885.
- OKAMOTO, H.; IWASE, T.; NARA, Y.; MORIOKA, T.; Studies on mechanism of bactericidal actino by low energy laser. **Journal Dent Health**, v.40, n.4, p.536-537, 1990.
- OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T.; Dye- Mediated Bactericidal Effect of He-Ne laser irradiation on Oral Microorganisms. **Lasers Surgical Medicine**, p.451-458, 1992.
- OLEINICK, N.L.; EVANS, H.H.. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. **Radiation Research**, v.1505, p.146-56, 1998.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WASHBURN, P. J. Effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. **Journal Veterinary Medicine**, v. 40, n. 7, p. 508-514, 1993.

OWENS, W.E.; NICKERSON, S.C.; WASHBURN, P.J. et al. Antibiotic therapy of intramammary infections in bred dairy heifers. **Louisiana Agriculture**, v.37, p.20- 23, 1994.

PALERMO-NETO, J. Resíduos de antimicrobianos em alimentos, **Revista CFMV**, n.22, p.65-71, 2001.

PARDO, R. B.; STURION, D. J.; BASILE, J. R.; CHAVES NETO, A. F.; DUARTE, D. D. da S.; FERNANDES, A. A.; YOKOSAWA, S. Y.; MENCK, R. C.; GODOY, C. A.; FARINAZZO, A. M.; PANÍCIO, E. M. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas (PR). **UNOPAR Cient., Ciência Biologia Saúde**, v.1, n.1, p.25-30, 1999.

PHILPOT, W. N. Control of mastitis by hygiene and therapy. **Veterinary Clinics of North America Large Animal Practice**, v.6, p.233-245, 1984.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter Attack**. Naperville: Babson Bros., 150 p, 1991.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; M YLLYS, V.; HONKANENBUZALSKI, T. Bovine Mastitis in Finland 2001 –prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2433-2441, 2004.

POELS, R. **Mastitis bei Rind, Schaf und Ziege**, Tijdschr. Veeartsenijk., n.37, p.789-824,1910.

PRATA, L.F. **Fundamentos de ciência do Leite**. Jaboticabal: FUNEP, 287p., 2001.

RADOSTITIS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Veterinary medicine**. 3ed. Londres, Baillière Tindall, p.563-627, 1994.

RIBAS, N.P. Análise do Leite. **Revista de Gado Holandês**, São Paulo, v. 2, n. 18, p. 26–31, 1994.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L.A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S., Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do rio grande do sul, **Revista Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 3, p.287-290, 2003.

RIGAU, J. **Acción de La luz laser a baja intensidad em La modulaciobn de La função celular**, 87p., Tese (Doutorado) – facultat de Medicina e I Ciéncias de La Salut, Universitat Rovira I Virgili, Espanha, 1996.

RYCHNER, R. **Bujatrik** (Stand und Fortgang der Tierheilkunde). Leipzig: Fischer, p.293-318, 1835.

ROSENBERGER, G. **Exame clinic dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.329-341, 1983.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em medicina Veterinaria e Zootecnia, 265p, 2002.

SANKAR, M.Y. Laser physics for clinicians. Neurosurgery: **State of Art Reviews**, v.2, n.2, 1987.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, n.2, 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CIETEP/FIEP, p.21-26, 2000

SCHALM, O. W.; JAIN, E.J.; JAIN, N.C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 11, p.249-282, 1971.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, n.5, p.199-207, 1957.

SCHULTZ, R.J., HARVEY, G.P., FRENANDEZ-BEROS, M.E.; et al.; Bactericidal effects of the Nd:YAG laser: in vitro study. **Lasers Surgical Medical**, n.6, p.445-448, 1990.

SIBATA, H. Photodynamic Therapy: a new concept in medical treatment Brazilian. **Journal Medical Biology Research**, v.33, p.869-880, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 295p, 1998.

SKOBELKIN, O.K.; BREKHOV, E.I.; CHEGIN, V.M.; DERBENEV, V.A.; PETUSHKOV, V.V. The carbon dioxide laser in the complex treatment of acute suppurative lactation mastitis. **Vestn Khir Im I I Grek.**, v.132, n.1, p.67-9, 1984.

SKOBELKIN, O.K.; DERBENEV, V.A.; VELIKII, P.I.A., TSYGANOVA, G.I. Use of lasers in the treatment of acute suppurative lactation mastitis. **Vestn Khir Im I I Grek.**, v.141, n.9, p.46-9, 1988.

SLAGHUIS, B. Sources and significance of contaminants on different levels of raw milk production. In: Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk, Wolfpassing, 1996. **Proceedings Brussels: International Dairy Federation**, p.19-27, 1996.

SOL, J.; SAMPIMON, O.C.; SNOEP, J.J.; SCHUKKEN, Y.H. Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.11, p.2803-2808, 1997.

- SOUKOS, N.S.; WILSON, M.; BURNS, T. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. **Lasers Surgical Medicine**, n.18, p.253-259, 1996.
- SOUKOS, N.S.; FYVIE, L.A.X.; HAMBLIN, M.R.; SOCRANSKY, S.S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobiology Agents Chemoter**, n.42, p.2595-2601, 1998.
- STERNBERG, E.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C., Porphyrin-based Photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. **Tetradron**, v.54, n.17, p.4151-4202, 1998.
- STOFFEL, M.; SCHALLIBAUM, M., SCHILT, W.; GERBER, H. Low-energy He-Ne-laser irradiation of the bovine mammary gland. **Zentralbl Veterinarmed A**. v.36, n.8, p.596-602, 1989.
- SUHREN G.; WALTE, H.G. First experiences with automation flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Milchwissenschaft**, v.50, n.3, p.249-275, 1999.
- TAPPEINER, H.V.; JESIONCK, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. **Munch Med Wochenschr**, v.50, p.2042, 1903.
- TORRES, C.L.A. **Mamite bovina**. Florianópolis: EMPASC, 1985.
- TYLER, J. W.; WILSON, R. C.; DOWLING, P. Treatment of subclinical mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 8, n. 1, p. 17-28, 1992.
- VENEZIO. F., DIVINCENZO, C.; SHERMAN, M.. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **Journal Infectious diseases**, v.151, n.1, 1985.
- VON FRANCK, L. **Handbuch der Tierärztlichen Geburtshilfe**. Berlin: Verlag Miegant Hempel; Paren, p.549-566, 1876.
- VON WILLBURG, A.K.; Anleitung für das Landvolk in Absicht auf die erkenntnis und Heilungsart der Krankheiten des Rindviehes, **Nürnberg Verlag Stein**, p.67-138, 1787.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Antimicrobiology Chemother Journal**, n.42, p.13-28, 1998.
- WEIGT, U. **Untersuchungen über die bovine Hefemastitis unter besonderer Berücksichtigung ihrer Entstehung**. Tierarztl. Hochschule, Habil. –Schr., 1973.
- WELBORN, R. Zur Diagnose und Einteilung der Euterentzündungen, **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, n.65, p.497-503, 1994.
- WELLENBERG, G.J.; POEL, W.H.M.; OIRSCHOT, J.T.. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.27-45, 2002.
- WENDT, K.; BOSTEDT, H.; MIELKE, H.; FUCHS, A. W. **Euter – und Gesäugekrankheiten**. Stuttgart: Fischer, p.226-431, 1994.

WILSON, R.S. Anesthetic management for tracheal reconstruction. In: Grillo, H.C., Eschapsse H (eds) International trends in general thoracic surgery, Major challenges. **WB Saunders**, Philadelphia, v.2, p.3-12, 1986.

WISE, R.; HART, T.; CARS, O. Antimicrobial resistance. **Brasilian Medical Journal**, p.609-610, 1998.

ZANIN, I.C.J.; GONÇALVES, R.B.; BRUGNERA JUNIOR, A. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an vitro study. **Journal Antimicrobiology Chemother**, v.56, n.2, p.324-30, 2005.

ZHUANG, S. Caspase-8 mediates caspases-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. **Experiece Cells Resourve**, v.250, p.203-212, 1999.