

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA SAFRANINA-O EM SOLUÇÃO AQUOSA FRENTE A *S. aureus*

Cleveland Soriano Neto, Brenda Ferreira Pachêco, Carlos Eduardo de Souza Duarte, Gabriela Lantorno de Souza, Janaína Cecilia Oliveira Villanova, Juliana Alves Resende.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, Alegre-ES, 29500-000, Brasil, csorianoneto@gmail.com, brendafpacheco@hotmail.com, caduarte2018@hotmail.com, gabriela.jantorno@hotmail.com, pharmacotecnica@yahoo.com.br, juliana.resende@ufes.br.

Resumo

A mastite bovina é uma doença de grande impacto na produção de leite, gerando gastos ao produtor que são convertidos em prejuízos para o mesmo. Um dos principais causadores desta doença é o *Staphylococcus aureus*. O tratamento inclui práticas de higiene e produtos antimicrobianos, como o iodo. Este estudo avalia a safranina-O, em uma concentração final de 0,84% p/p como alternativa para tratar mastite. A eficácia da safranina contra *S. aureus* (ATCC 25923) foi testada em comparação com iodo (1%). Resultados mostraram inibição de crescimento bacteriano pela safranina. Esses resultados destacam o potencial da safranina como agente antimicrobiano, especialmente contra bactérias Gram-positivas. A pesquisa incentiva investigações adicionais e possíveis aplicações clínicas para o tratamento da mastite bovina.

Palavras-chave: Mastite. *Staphylococcus aureus*. Safranina.

Área do Conhecimento: Microbiologia.

Introdução

O leite é um alimento extremamente nutritivo, estando presente na dieta da maior parte da população mundial. Considerado o primeiro entre os produtos brasileiros de origem animal, em 2021 este alimento movimentou cerca de R\$ 68,173 bilhões, caracterizando-o como um alimento de grande impacto para economia brasileira (IBGE, 2021).

A mastite bovina é uma das doenças mais comuns e prejudiciais para a indústria leiteira em todo o mundo. Trata-se de uma inflamação da glândula mamária, causada principalmente pela invasão de microrganismos patogênicos, resultando em prejuízos econômicos significativos devido à queda na produção de leite, deterioração da qualidade do produto e custos com tratamentos e medidas preventivas (ALVES *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2018).

Entre os diversos microrganismos capazes de causar mastite bovina, estima-se que 90% das inflamações são resultado de infecções por *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (MASSOTE *et al.*, 2019). Tornando-os de grande importância clínica. O *Staphylococcus aureus* possui mecanismos de virulência que facilitam a sua disseminação no tecido mamário, causando prejuízos à saúde humana e animal (NADER FILHO *et al.*, 2022). Dentre estes mecanismos: a produção de biofilme facilita a adesão e multiplicação do microrganismo no epitélio mamário; produção de toxinas, como lipases e enterotoxinas estafilocócicas, capazes de evadir a defesa imunológica do consumidor e invadindo tecidos e células, com as hemolisinas (BENVENGA, 2019).

Dessa forma, o tratamento do gado leiteiro é fundamental para evitar maiores perdas na produção. No intuito de minimizar o desenvolvimento de microrganismos causadores da mastite e demais doenças, utiliza-se práticas de higiene do habitat, equipamentos, utensílios, das mãos e assepsia dos tetos antes e após a ordenha (pré-dipping e pós-dipping, respectivamente) com produtos antimicrobianos como produtos químicos com ação antimicrobiana como cloro, iodo ou quaternário de amônio (LOPES *et al.*, 2020; SCHELLES, 2021). O iodo é um dos mais utilizados por ser menos irritante e corrosivo que os demais, a concentração utilizada situa-se em uma faixa de 0,5%-1%, caso ultrapasse 1%, pode causar interferências no sabor e gerar aumento dos teores de iodo no leite (BACH *et al.*, 2019).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A utilização adequada de agentes antimicrobianos visa diminuir a quantidade de microrganismos prejudiciais e prevenir a possível propagação de agentes infecciosos. Dado a ausência de um agente antimicrobiano ideal, devem-se considerar premissas fundamentais para a seleção criteriosa de um desinfetante apropriado, a saber: a abrangência de espectro de ação, a ausência de toxicidade e irritabilidade para os tecidos de origem humana e animal, a manifestação de estabilidade cutânea e a viabilidade econômica do agente.

Por conta disso, alternativas de tratamento para a mastite bovina devem ser pesquisadas, como a safranina-O. Estudo recente mostrou que a safranina apresenta uma ação fotossensibilizadora, sendo ativada pela luz visível, danificando estruturas celulares e causando a inibição de microrganismos (DA SILVA JUNIOR *et al.*, 2020). Ainda, Al-Khikani e Ayit (2022) demonstrou uma eficácia antibacteriana significativa contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*. No entanto, sua eficácia contra bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, foi menor em comparação com outros corantes testados, como o violeta de genciana e o iodo. A safranina mostrou ter uma atividade antibacteriana mais forte contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas.

Neste contexto, o presente estudo busca avaliar a atividade antimicrobiana da solução de safranina-O (SFO), na inibição bacteriana de *S. aureus*, principal microrganismo causador de mastite. O presente trabalho visa a viabilidade do uso da SFO como agente destinado à assepsia e profilaxia da mastite, como alternativa aos tratamentos convencionais.

Metodologia

A safranina-O (cloreto de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenilfenazina) foi adquirida comercialmente (Dinâmica®). Para a preparação da solução, a safranina-O foi dissolvida em água estéril como solvente, resultando em uma concentração final de 0,84% p/p. O iodo comercial (iodopovidona) com 1% de iodo ativo foi empregado como controle positivo.

A eficácia da formulação foi avaliada utilizando linhagens controle de *S. aureus* (ATCC 25923). Inicialmente, cultivou-se a linhagem em meio BHI ($35 \pm 2^\circ \text{C}$), por 24 horas. Após o crescimento, uma suspensão bacteriana foi preparada em solução salina estéril (NaCl 0,9%), comparando a turbidez óptica ao padrão 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$). Posteriormente, inoculou-se 100 μL da cultura padronizada em 9900 μL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), obtendo $1,5 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$. Em seguida, 300 μL foram inoculadas em 29700 μL de Caldo Mueller Hinton (CMH), obtendo assim $1,5 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$.

Em tubos de vidro estéreis, adicionou-se 3 mL da cultura de microrganismos ($1,5 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$) e 0,3 mL da solução testada. Analisou-se a solução aquosa de safranina-O e solução de iodo. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica ($35 \pm 2^\circ \text{C}$), por 24 horas. Além disso, um controle de crescimento foi realizado, 3 mL da cultura de microrganismos ajustada e 1 mL de solução salina estéril.

Após o período de incubação, foram preparadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em caldo Mueller Hinton (CMH) a partir dos tubos testes e do controle de crescimento. Inoculou-se 100 μL de cada diluição na superfície de placas de ágar caseína em duplicata e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski, para a contagem do número de microrganismos viáveis. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 72 horas. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de UFC/placa. Os limites máximos e mínimos para contagem de microrganismos viáveis foram estabelecidos com base em regras gerais de contagem de microrganismos viáveis (25 – 250 UFC). As placas com número de colônias superiores a 250 UFC deverão ter o resultado registrado como incontáveis.

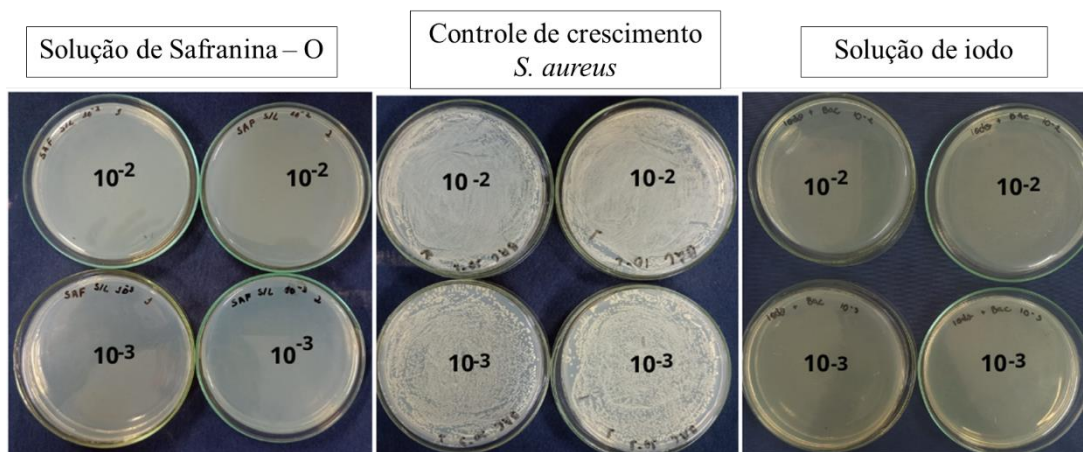
A formulação é considerada eficaz frente a linhagem avaliada caso ocorra a inibição do crescimento microbiano ou redução da densidade populacional bacteriana. A densidade populacional foi contabilizada conforme fórmula a seguir: $\text{UFC/mL} = (\text{número de UFC} \times \text{fator de diluição}) / (\text{alíquota de plaqueamento})$.

Resultados

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Após o período de incubação em placas de petri contendo ágar caseína, procedeu-se a contagem de microrganismos viáveis, conforme ilustrado na Figura 1. Observa-se crescimento incontável em todas as placas de controle de crescimento. Em contrapartida, as soluções de SFO e o iodo (controle positivo) apresentaram inibição completa do crescimento de *S. aureus*.

Figura 1 – Foto ilustrativa das placas indicando a atividade antimicrobiana da solução de safranina (0,84% p/p) e da solução de iodo (1%), em comparação com o controle de crescimento (*S. aureus* ATCC 25923).



Fonte: Os autores, 2023.

Discussão

A safranina é um corante utilizado em técnicas de coloração em histologia e citologia. É usada como contracoloração em diversas técnicas de coloração, incluindo a coloração de Gram e a coloração de endósporos. A safranina é conhecida por corar os núcleos celulares de vermelho, permitindo a visualização de estruturas celulares em microscopia (TRAN *et al.*, 2000). No entanto, além de seu papel como corante, este estudo sugere que a safranina também possui atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

Apenas alguns estudos analisaram a atividade antibacteriana da safranina. Um trabalho de Rodrigues *et al.* (2023) avaliou a atividade antimicrobiana da solução de safranina em água, limitando-se ao máximo de 150 µg/mL, obtendo como resultado a ineficácia da solução de safranina em reduzir as linhagens de bactérias testadas. Contudo, a metodologia adotada é diferente da utilizada, sendo avaliado a concentração de safranina ($8,4 \times 10^3$ µg/ml) bem menor que a testada no presente estudo.

Uma possível explicação para a atividade antimicrobiana da safranina é que ela pode interagir com componentes celulares das bactérias, como proteínas e outras moléculas, de maneira a afetar sua viabilidade e crescimento. A safranina pode penetrar nas células bacterianas e ligar-se a alvos específicos, interferindo em suas funções vitais. Sabe-se que esta substância é capaz de adentrar nas membranas celulares, como é observado na coloração de Gram e há relatos de inativação de algumas cepas de bactérias (SÁNCHEZ, 2012).

No entanto, é importante notar que os mecanismos precisos pelos quais a safranina exerce sua atividade antimicrobiana ainda podem não estar completamente esclarecidos, e mais pesquisas são necessárias para compreender melhor seus efeitos e potencial terapêutico.

Essa pesquisa destaca o crescente interesse em reutilizar a safranina como agente antimicrobiano, especialmente diante do desafio crescente representado por bactérias resistentes a antimicrobianos. A capacidade da safranina de direcionar uma variedade de patógenos, aliada à sua acessibilidade e relativamente poucos efeitos negativos, a torna uma candidata atraente para investigações adicionais e potencial aplicação clínica (AL-KHIKANI; AYIT, 2022). Os resultados do estudo apoiam a consideração da safranina para o tratamento de infecções bacterianas, com foco em organismos Gram-positivos, como *S. aureus*, principal causador da mastite bovina.

Conclusão

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Foi observado atividade antimicrobiana da solução de safranina, sendo capaz de inibir o crescimento da *S. aureus* nas placas testadas. Com isso, a solução apresenta-se como uma alternativa ao tratamento convencional, que utiliza o iodo (1%).

Referências

AL-KHIKANI, F.; AYIT, A. The Antibacterial Action of Safranin and Gentian Violet. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 13, n. 3, 2022.

ALVES, B. F. C. *et al.* Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina: revisão. **Pubvet**, v. 14, p. 141, 2019.

BACH, A. T. *et al.* Eficácia do uso de desinfetantes no manejo de ordenha de vacas leiteiras no controle da mastite e seus agentes infecciosos—revisão bibliográfica. Bagé-RS. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 1, p. 188-204, 2019.

BENVENGA, G. U. **Avaliação da expressão do gene bap como fator de virulência de *Staphylococcus spp.* isolados de mastite bovina**. 2019. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, 2019.

CABRAL, J. F. **Avaliação da qualidade do leite de tanques de propriedades leiteiras do Estado do Paraná**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, 2020.

DA SILVA-JUNIOR, R. C. *et al.* Photothermal stimuli-responsive hydrogel containing safranin for mastitis treatment in veterinary using phototherapy. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 1, p. 581-596, 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2021**. IBGE, v. 49, p.1-12, 2021.

LOPES, T. S. *et al.* Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 131, p. 186-193, 2020.

MASSOTE, V. O. *et al.* DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE MASTITE BOVINA: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**. v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019

NADER FILHO, A. *et al.* Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 1-4, 2022.

RODRIGUES, B. M. **Inativação fotodinâmica de microrganismos contaminantes do leite**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, 2021.

RODRIGUES, T. P. *et al.* Mastite bovina-influência na produção, composição e rendimento industrial do leite e derivados. **Arq. Pesqui. Anim**, v. 1, p. 14-36, 2018.

RODRIGUES, B. M. *et al.* Safranin-O-Mediated Photodynamic Inactivation of Microorganisms Reduces Milk Contaminating Bacteria Count and Prevented New Cases of Mastitis. **Tropical Animal Science Journal**, v. 46, n. 1, p. 122-130, 2023.

SÁNCHEZ, H. I. A. Colorante safranina O. **Investigación en discapacidad**, v. 1, n. 2, p. 83-85, 2012.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

SHELLES, J. L. *et al.* Uso de extrato de própolis como agente antisséptico para pré e pós dipping em vacas leiteiras. **Agrarian**, v. 14, n. 51, p. 95-101, 2021.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES); da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES): Edital Nº 10/2021 - Programa de Iniciação Científica Júnior do Espírito Santo (PICJr 2022), TO 092/2022 e TO 093/2022.