

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EMULGEL DESINFETANTE NATURAL COM TERAPIA
FOTODINÂMICA E MINERAIS QUELATADOS NA
PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA

Autora: Amanda Sandes Bispo
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magali Soares
dos Santos Pozza
Coorientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti
Daniel

Maringá – PR
Fevereiro – 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EMULGEL DESINFETANTE NATURAL COM TERAPIA
FOTODINÂMICA E MINERAIS QUELATADOS NA
PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA

Autora: Amanda Sandes Bispo
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Magali Soares
dos Santos Pozza
Coorientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti
Daniel

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal/Produção e Nutrição de Grandes Ruminantes

Maringá – PR
Fevereiro– 2025

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

B622e Bispo, Amanda Sandes
Emugel desinfetante natural com terapia fotodinâmica e minerais quelatados na prevenção da mastite bovina : . / Amanda Sandes Bispo. -- Maringá, PR, 2025.
89 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza.
Coorientadora: Profa. Dra. João Luiz Pratti Daniel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2025.

1. Qualidade de leite. 2. Sistema imunológico. 3. Minerais quelatados - Extratos naturais. 4. Microbiologia do leite. 5. Fotoinativação. I. Pozza, Magali Soares dos Santos, orient. II. Daniel, João Luiz Pratti, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-

CDD 23.ed. 637.1277

Ademir Henrique dos Santos - CRB-9/1065



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EMULGEL DESINFETANTE NATURAL COM TERAPIA
FOTODINÂMICA E MINERAIS QUELATADOS NA
PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA

Autora: Amanda Sandes Bispo
Orientadora: Profª Drª Magali Soares dos Santos Pozza

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 27 de fevereiro de 2025.

P/MSR

Prof. Dr. Rodolpho Martin do
Prado

P/MSR

Profª Drª Maximiliane Alavarse
Zambom

MSR

Profª Drª Magali Soares dos Santos Pozza
Orientadora

“Até aqui o senhor nos ajudou”

1 Samuel 7:12

Ao

meu pai e à minha mãe que
foram o início de tudo

À

minha irmã Mylena pelo estímulo

Aos

meus amigos de pós-graduação, pelo companheirismo e pelo incentivo.

Aos

meus familiares, pelo apoio e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora

À minha família, que sempre me incentivou e apoiou até aqui.

À Empresa NUTRIPHÓS, pela oportunidade oferecida e apoio para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

À Prof^a. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza, pela dedicada orientação e ensinamentos.

Ao Departamento de Zootecnia, UEM, que muito contribuiu para a realização deste curso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da UEM.

Aos colegas de curso Lucas Castro, Uilquer Santos e Diego Pacheco, pela amizade, apoio, demonstração de companheirismo e memórias afetivas.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi (“Dú” e Célio), pelo auxílio no manejo com os animais.

À Equipe de Estudos em Qualidade de Alimentos e Microbiologia, em especial a estagiária Giovana de Paula.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

AMANDA SANDES BISPO, filha de Marcia Roseli Cafacio Sandes e Paulo César Bispo, nasceu em Paranavaí, Paraná, no dia 02 de fevereiro de 1999.

Em fevereiro de 2023, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2023, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá.

No dia 27 de fevereiro de 2025, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
I -INTRODUÇÃO	
1. Revisão bibliográfica.....	22
1.1 Bovinocultura de leite	22
1.2 Mastite Bovina	23
1.3 Classificação quanto aos tipos de mastite.....	24
1.4 Classificação quanto as formas de contaminação do leite.....	24
1.5 Patógenos causadores de mastite.....	25
1.6 Diagnóstico de mastite.....	25
1.7 Métodos de controle e prevenção de mastite.....	26

1.8 Extratos Naturais e seus Compostos Bioativos na Prevenção de infecções.....	28
1.9 Jurema-	
preta.....	28
1.10 Óleo de	
copaíba.....	29
1.11 <i>Chlorella</i>	
<i>vulgaris</i>	31
1.12 Emulgel como sistema de liberação	
tópica.....	34
1.13 Aplicação de Terapia Fotodinâmica	
(FTD).....	33
2.	
Minerais.....	34
2.1	
Selênio.....	36
2.2	
Cobre.....	36
2.3	
Zinco.....	37
2.4 Minerais	
quelatados.....	37
2.5 Importância dos minerais	
quelatados.....	38
2. Referências	
Bibliográficas.....	39

II-OBJETIVOS

GERAIS.....	49
-------------	----

III. EMULGEL DESINFETANTE NATURAL ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PARA PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA

Resumo.....	
.51	

Abstract.....	.51
Introdução.....	.52
Material e Métodos.....	53
Resultados e Discussão.....	55
Conclusões.....	.67
Referências.....	68

IV - SUPLEMENTAÇÃO COM NÚCLEO MINERAL CONTENDO MINERAIS QUELATADOS PARA PREVENÇÃO DA MASTITE

Resumo.....	.73
Abstract.....	.73
Introdução.....	.74
Material e Métodos.....	75
Resultados e Discussão.....	77
Conclusões.....	.86
Referências.....	86

V - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
--	-----------

LISTA DE ABREVIACÕES

TFDa - Terapias Fotodinâmicas Antimicrobianas

CCS – Contagem de Células Somáticas

CMT - California Mastitis Test

OC - Óleo de copaíba

EROs - Espécies Reativas De Oxigênio

Ca – Cálcio

P – Fósforo

K – Potássio

Na – Sódio

Cl – Cloro

Mg – Magnésio

S – Enxofre

Zn – Zinco

Cu – Cobre

Se – Selênio

I – Iodo

Fe – Ferro

Mn – Manganês

Co – Cobalto

CuZn SOD - Superóxido Dismutase Cobre-Zinco

TPA - análise do perfil de textura

CIM - Concentração Inibitória Mínima

LDR - leite desnatado reconstituído

BP - Ágar Baird Parker

EJO – emulgel de jurema-preta, óleo de copaíba

EJOC – emulgel de jurema-preta, óleo de copaíba, *Chlorella*

MS – Matéria seca

MM – Matéria mineral

PB – Proteína bruta

EE – Extrato etéreo

LANA – Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal

CMETL – Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia de Leite

LISTA DE TABELAS

I REVISÃO DE LITERATURA

Páginas

TABELA 1. Contagem de Células Somáticas expressa em números de células por mililitros(células/mL).....	
26	

III. EMULGEL DESINFETANTE NATURAL ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PARA PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA

TABELA 1. Caracterização mecânica de emulgéis de óleo de copaíba, jurema-preta e <i>Chlorella</i> e bioadesividade em pele <i>ex vivo</i>	
.56	
TABELA 2. Atividade bactericida do extrato de jurema-preta e <i>Chlorella vulgaris</i> sobre isolados de <i>S. aureus</i> presentes em biofilme.....	
62	
TABELA 3. Contagem de células somáticas no leite, contagem de estafilococos nos tetos e leite de vacas submetidas à aplicação de emulgéis.....	
63	
TABELA 4. Análise de parâmetros hematológicos de vacas utilizando pós-dipping com extratos de jurema-preta, óleo de copaíba e <i>Chlorella</i>	
65	

IV. SUPLEMENTAÇÃO COM NÚCLEO MINERAL CONTENDO MINERAIS QUELATADOS PARA PREVENÇÃO DA MASTITE

TABELA 1. Composição química (%MS) da silagem de milho (SM), milho moído (MM), farelo de trigo (FT), farelo de soja (FS), ração convencional, controle (C) e teste (T) para vacas em lactação.....	76
--	----

TABELA 2. Análise de células somáticas, composição físico-química do leite e análise microbiológica do leite de vacas submetidas à suplementação com núcleo mineral.....	81
--	----

TABELA 3. Análise de Parâmetros Hematológicos de vacas utilizando núcleo mineral.....	83
---	----

LISTA DE FIGURAS

I REVISÃO DE LITERATURA

	Página
FIGURA 1. Sinais clínicos de mastite clínica e teste de contagem de células somáticas para detecção de mastite subclínica.....	26
FIGURA 2. Ilustração da árvore da espécie Jurema-preta (<i>Mimosa tenuiflora</i>)	.29
FIGURA 3. Extrativismo do óleo de copaíba, proveniente da árvore de copaíba.....	31
FIGURA 4. Extrato de microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	32
FIGURA 5. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana associada a emulgel de extrato de jurema-preta, <i>Chlorella vulgaris</i> e óleo de copaíba no pós-dipping em vacas	

leiteiras.....	
34	

III. EMULGEL DESINFETANTE NATURAL ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PARA PREVENÇÃO DA MASTITE BOVINA

FIGURA 1. Reologia de cisalhamento contínuo das formulações a 38°C; Curvas de fluxo de sistemas emulgel; EJOC = jurema-preta, óleo de copaíba, <i>Chlorella</i> ; EJO = jurema-preta, óleo de copaíba.....	
57	

FIGURA 2. Reograma de cisalhamento contínuo a 38°C; EJO=jurema-preta, óleo de copaíba; EJOC = jurema-preta, óleo de copaíba e <i>Chlorella</i>	
58	

FIGURA 3. Resultado da avaliação da citotoxicidade das fórmulas contra Fibroblastos; EJOC=emulgel de jurema-preta, óleo de copaíba e <i>Chlorella</i> ; EJO= emulgel de jurema-preta, óleo de copaíba.....	
59	

FIGURA 4. Genes para produção de enterotoxina e alfa hemolisina; A) Imagem de eletroforese em gel de agarose do gene <i>hla</i> (210 pb); B) gene <i>hly</i> (300 pb); C) gene <i>sea</i> (120 pb) de diferentes isolados de <i>S. aureus</i> do leite de vaca.....	
.60	

FIGURA 5. Inativação fotodinâmica de 12 cepas de <i>S. aureus</i> em leite LDR 10%; LDR + <i>Chlorella</i> com e sem fotoinativação; Com <i>Chlorella</i> = cepas com <i>Chlorella</i> após 10 min no escuro a 5 °C; Sem <i>Chlorella</i> = cepas sem <i>Chlorella</i> após 10 min no escuro a 5 °C; 5 min, 10 min e 15 min = tempos de exposição à fotoinativação das 12 cepas isoladas.....	
.61	

RESUMO

A mastite, inflamação da glândula mamária de vacas leiteiras, é frequentemente causada por microrganismos como *Staphylococcus aureus* e leva à redução da qualidade e produção do leite, além de aumentar os custos com o tratamento. Entre os métodos utilizados convencionalmente, o pós-*dipping* com desinfetantes químicos é amplamente utilizado, mas pode deixar resíduos no leite. Como alternativa, o uso de terapias fotodinâmicas antimicrobianas (TFDa) associado a extratos naturais e emulgéis tem se mostrado promissor. Substâncias como óleo de copaíba, extrato de *Chlorella vulgaris* e *Mimosa tenuiflora* apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias que auxiliam na prevenção e tratamento da mastite. O presente estudo também explorou o papel de minerais quelatados, como zinco, cobre e selênio, que aumentam a imunidade e contribuem para redução da contagem de células somáticas (CCS) no leite. Essas abordagens buscam minimizar o uso de antibióticos, evitar resíduos químicos no leite e melhorar a saúde dos animais de forma sustentável. O experimento 1 avaliou *in vitro* e *in vivo* a inativação fotodinâmica de microrganismos utilizando extratos naturais de jurema-preta, óleo de copaíba e *Chlorella vulgaris* como pós-*dipping* para vacas em lactação. Foram utilizadas 12 vacas das raças Holandesa e Jersey. Os tratamentos incluíram: T1- grupo controle utilização de iodo, T2- aplicação de emulgel EJO (jurema-preta e óleo de copaíba) sem iluminação e T3- aplicação de emulgel EJO com iluminação (jurema-preta, *Chlorella vulgaris* e óleo de copaíba). Os tetos foram irradiados com luz Led vermelha. As formulações, foram submetidas à caracterização mecânicas, reológicas e estudos de estabilidade, evidenciando que ambas obtiveram estabilidade, comportamento pseudoplástico e natureza elástica. Avaliações *in vitro* contra *S. aureus* (ATCC 25923), evidenciaram ação antibacteriana dos extratos, sendo o tratamento com iluminação mais efetivo para *Chlorella*, jurema-preta e óleo de copaíba. Em ensaios *in vivo*, não houve diferença significativa nas CCS do leite e contagem microbiológica de aeróbios mesófilos entre os tratamentos, indicando que as formulações têm grande potencial para aplicação tópica, equiparando-se ao iodo. Os resultados sugerem que os emulgéis podem ser usados como desinfetantes eficazes no pós-*dipping*. O experimento 2 avaliou a

eficácia de um núcleo mineral contendo minerais quelatados na ativação do sistema imunológico, na melhoria da qualidade do leite e na redução da CCS em vacas leiteiras para prevenir a mastite. Foram usadas oito vacas das raças Holandesa e Jersey, em delineamento *cross-over* sendo dois tratamentos: T1 (núcleo mineral contendo minerais quelatados) e T2 (núcleo mineral controle. O núcleo mineral testado continha cobre, zinco e selênio na forma quelatada, além, de vitamina E, niacina e antioxidantes, enquanto o controle possuía apenas calcário, palatabilizantes e aromatizantes. O leite foi coletado nos dias 0 e 28 para análises de CCS, contagem de aeróbios mesófilos e composição físico-química. Amostras de sangue foram colhidas para avaliação do perfil nutricional. Experimento 1: O estudo *in vitro* demonstrou que os tratamentos com luz foram eficazes na redução de *S. aureus* (ATCC 25923) em todas as concentrações avaliadas, além de promoverem a ruptura de biofilmes pré-formados. No ensaio *in vivo*, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas CCS, de aeróbios mesófilos e nos parâmetros hematológicos entre os tratamentos testados. Experimento 2: Não houve diferenças significativas entre tratamentos para CCS, contagem de aeróbios mesófilos, composição físico-química do leite e hemograma entre os tratamentos ($p > 0,05$). No entanto, a produção de leite foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com minerais quelatados. Os estudos demonstraram que os emulgéis com extratos naturais e terapia fotodinâmica são promissores como desinfetantes no pós-*dipping*, equiparando-se ao iodo. Além disso, os minerais quelatados aumentaram na produção de leite, destacando seu papel na saúde animal e na produção sustentável.

Palavras-chave: qualidade de leite, extratos naturais, fotoinativação, microbiologia do leite, minerais quelatados, sistema imunológico.

ABSTRACT

Mastitis, which is mammary gland inflammation in dairy cows, is often caused by microorganisms such as *Staphylococcus aureus* and leads to a reduction in milk quality and production, as well as increasing treatment costs. Among the methods used conventionally, post-dipping with chemical disinfectants is widely used, but can leave residues in the milk. As an alternative, the use of antimicrobial photodynamic therapies (PDT) associated with natural extracts and emulgels has shown promise. Substances such as copaiba oil, *Chlorella vulgaris* and *Mimosa tenuiflora* extract have antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties that help prevent and treat mastitis. This study also explored the role of chelated minerals, such as zinc, copper and selenium, which increase immunity and contribute to reducing somatic cell counts (SCC) in milk. These approaches seek to minimize the use of antibiotics, avoid chemical residues in milk and improve animal health in a sustainable way. Experiment 1 evaluated *in vitro* and *in vivo* the photodynamic inactivation of microorganisms using natural extracts of jurema-preta, copaiba oil and *Chlorella vulgaris* as post-dipping for lactating cows. Twelve Holstein and Jersey cows were used. The treatments included: T1- control group using iodine, T2- application of EJO emulgel (black jurema and copaiba oil) without lighting and T3- application of EJOC emulgel with lighting (black jurema, *Chlorella vulgaris* and copaiba oil). The teats were irradiated with red Led light. The formulations were submitted to mechanical and rheological characterization and stability studies showed that both extracts had stability, pseudoplastic behavior and an elastic nature. *In vitro* evaluations against *S. aureus* (ATCC 25923) showed the antibacterial action of the extracts, with the lighting treatment being the most effective for *Chlorella*, black jurema and copaiba oil. In *in vivo* tests, there was no significant difference in milk SCC and microbiological count of mesophilic aerobes between the treatments, indicating that the formulations have great potential for topical application, on a par with iodine. The results suggest that emulgels can be used as effective post-dipping disinfectants.

Experiment 2 evaluated the effectiveness of a mineral core containing chelated minerals in activating the immune system, improving milk quality and reducing SCC in dairy cows to prevent mastitis. Eight Holstein and Jersey cows were used in a *cross-over* design with two treatments: T1 (mineral core containing chelated minerals) and T2 (control mineral core). The mineral core tested contained copper, zinc and selenium in chelated form, as well as vitamin E, niacin and antioxidants, while the control contained only limestone, palatability enhancers and flavorings. Milk was collected on days 0 and 28 for analysis of SCC, mesophilic aerobic count and physicochemical composition. Blood samples were taken to assess the nutritional profile. Experiment 1: The *in vitro* study showed that the light treatments were effective in reducing *S. aureus* (ATCC 25923) at all the concentrations evaluated, as well as breaking up pre-formed biofilms. In the *in vivo* test, there were no significant differences ($p > 0.05$) in SCC, mesophilic aerobes and hematological parameters between the treatments tested. Experiment 2: There were no significant differences between treatments for SCC, mesophilic aerobes count, milk physicochemical composition and blood count between treatments ($p > 0.05$). However, milk production was significantly higher ($p < 0.05$) in the group treated with chelated minerals. The studies showed that emulgels with natural extracts and photodynamic therapy are promising as post-*dipping* disinfectants, on a par with iodine. In addition, chelated minerals increased milk production, highlighting their role in animal health and sustainable production.

Keywords: milk quality, natural extracts, photoinactivation, milk microbiology, chelated minerals, immune system.

I. INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças mais recorrentes e preocupantes em propriedades leiteiras, gerando grandes prejuízos na qualidade e produção do leite (Tozzetti, 2008). Trata-se de uma inflamação da glândula mamária causada por estresse, traumas ou infecções por microrganismos como bactérias, fungos, leveduras e vírus (Schvarz & Santos, 2021). Para controle e prevenção, o pós-*dipping* é um manejo amplamente utilizado, consistindo na imersão dos tetos em soluções desinfetantes para reduzir a carga microbiana (do Brasil et al., 2012). Produtos como iodo, hipoclorito de sódio e clorexidina são os mais usados (Benedette, 2018), porém podem deixar resíduos no leite, que podem ser prejudiciais à saúde humana (Schelles et al., 2021).

O principal desafio da presença de *Staphylococcus aureus* na produção de leiteira é o uso de antibióticos, que tem levado à resistência bacteriana e ao descarte do leite devido aos altos níveis de resíduos desses medicamentos. Além disso, a infecção causada por *S. aureus* pode resultar em mastites crônicas de tratamento, impactando qualidades na saúde dos animais, na qualidade do leite e no retorno da produção. Isso reforça a necessidade de estratégias alternativas e preventivas, como o uso de desinfetantes naturais no pós-dipping e a implementação de medidas de biossegurança para reduzir a incidência da infecção. (Langoni et al., 2017).

Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) que se baseia na utilização de um fotossensibilizador ativado por luz para espécies reativas de oxigênio que eliminam microrganismos, tem se mostrado uma opção eficiente no tratamento de infecções locais em animais e surge também como alternativa promissora para a remoção de biofilmes e auxílio no controle da qualidade do leite (Campanholi et al., 2018). Assim, a TFDa associado com extratos naturais de plantas fotossensíveis e um sistema de liberação como emulgel, para aplicação antimicrobianas e terapêuticas, vem se destacando no ramo da pesquisa. De acordo com estudo *in situ* realizado por Silva Junior et al. (2019), os autores indicaram eficiência da aplicação da TFDa em procedimentos pós-*dipping* visando a prevenção de mastite bovina.

Uma outra alternativa promissora para a prevenção da mastite é o fornecimento de núcleo mineral contendo minerais quelatados e vitaminas. Os minerais quelatados são capazes de se ligar a moléculas orgânicas, o que melhora sua absorção e biodisponibilidade no organismo animal. Na produção animal, estes contribuem para o desempenho produtivo, imunidade e saúde da glândula mamária, proporcionando condições para a vaca manifestar sua total produção de leite e redução da contagem de células somáticas (CCS) (Taylor, 2000; Andrieu, 2008; Mottin et al., 2013). Os custos associados ao tratamento da mastite são elevados, tornando essencial investir na prevenção adequada desta doença.

Assim, é fundamental explorar alternativas terapêuticas eficientes e sustentáveis, como as abordadas nesta pesquisa, que buscam minimizar os prejuízos econômicos e promover a saúde animal de forma segura e inovadora. Diante do exposto, este estudo objetivou avaliar a inativação fotodinâmica de microrganismos na redução da contaminação do leite e dos tetos dos animais por patógenos causadores de mastite bovina propondo um desinfetante pós-*dipping* fotossensível, contendo extratos naturais incorporados em matriz polimérica, para reduzir a contaminação por *S. aureus* no leite e nos tetos dos animais, assim como avaliar a eficiência na ativação do sistema imune e redução da CCS por meio de minerais quelatados na dieta dos animais visando a prevenção da mastite.

1. Revisão De Literatura

1.1. Bovinocultura De Leite

Dentro do agronegócio, as cadeias produtivas devem buscar maior qualidade dos seus produtos, tornando a busca por melhorias no setor um fator importante para a escolha dos consumidores. A cadeia do leite e seus derivados, são alimentos base para a alimentação da população mundial. Esse produto vem da agricultura familiar ou da produção tecnificada de grandes fazendas leiteiras, tendo sua qualidade de origem cada vez mais exigida (Ribeiro et al., 2022). O leite está entre os alimentos mais consumidos do mundo, sendo considerado uma fonte de nutrientes importantes para o desenvolvimento humano (Ribeiro et al., 2022).

O Brasil se destaca mundialmente na produção leiteira, desempenhando um papel fundamental na economia agropecuária ao gerar renda familiar, empregos e contribuições no setor. Além de ser um pilar econômico, a produção de leite é uma fonte essencial de alimento para o consumo interno, garantindo a segurança alimentar de diversas famílias (Rocha et al., 2013; Embrapa, 2023).

Com isso, torna-se necessário o acompanhamento diário na criação do gado leiteiro, a fim de evitar e/ou identificar doenças que pode comprometer a qualidade do produto e a sua comercialização. Porém, algumas doenças, como a mastite, podem tornar o sistema de produção leiteira oneroso, uma vez que gera despesas com o tratamento, com diminuição na produção e descarte de animais, sendo uma das doenças que mais acomete os rebanhos leiteiros afetando sua produção e comprometendo sua qualidade (Azooz et al., 2020; Sharun et al., 2021). O uso excessivo de bactérias, que pode deixar resíduos no leite, provoca preocupação pública, desvaloriza o produto e resulta no descarte de lotes (Cheng & Han, 2020).

1.2. Mastite Bovina

A mastite bovina gera prejuízos na área de produtores de leite e seus derivados lácteos. Os custos incluem desde medicamentos e serviços veterinários até o descarte de animais e leite contaminado, o que, além de representar um risco à saúde pública, compromete significativamente a qualidade do leite, impactando a rentabilidade da produção e prejudicando a confiança dos consumidores. Isso reforça a importância de estratégias de prevenção e controle eficientes para evitar a contaminação e reduzir os impactos econômicos e sociais.

De acordo com estimativas, o impacto que a mastite causa na economia pode chegar a 10% do faturamento das fazendas leiteira (Neiva, 2018). Segundo Essa et al. (2023), a mastite é uma inflamação da glândula mamária, normalmente causada por bactérias patogênicas, além de outros agentes infecciosos como fungos, vírus e parasitas presentes no ambiente. É uma das patologias mais recorrentes e críticas nos rebanhos leiteiros, devido ao seu alto impacto econômico (Pedersen et al., 2021). A mastite é uma inflamação complexa, causada pela interação entre o agente etiológico, o ambiente e o animal hospedeiro, de origens físicas, fisiológicas ou microbianas (Peters, 2012), a causa mais comum é infecciosa, destacando as bactérias (Caliman et al., 2023).

Ademais, a resistência bacteriana tornou-se uma ameaça crescente devido ao fato de que, convencionalmente nas propriedades leiteiras, o tratamento da mastite é a base de antibióticos, os quais podem levar ao desenvolvimento de cepas resistentes (Peng et al., 2022). Além disso, problemas com resíduos de medicamentos também foram relatados na literatura (Monistero et al., 2021; Vidal et al., 2022; Bordie et al., 2023).

1.3. Classificação quanto ao tipo de mastite

A mastite se manifesta em duas formas diferentes: a mastite clínica e a subclínica. A mastite clínica é considerada de fácil diagnóstico, pois apresenta sinais clínicos visíveis como alterações no leite (grumos, pus e sangue). Além de sinais de infecção e inflamação como edema e aumento de temperatura local, dor e sensibilidade no úbere, podendo acometer um ou mais quartos mamários (Schvarz & Santos, 2012). Em casos mais agudos, pode apresentar sintomas sistêmicos como febre, apatia, redução no apetite e queda na produção de leite, levando a redução da produção de leite, perda de tetos, até a morte (Demeu, 2015), podendo ser diagnosticada pelo teste da caneca ou Califórnia Mastite Teste (CMT).

Os custos associados a mastite clínica são relacionados a perda de produção de leite, onde pode causar uma redução na produção de leite, impactando negativamente a rentabilidade da propriedade, perdas com descarte de leite devido ao uso de antibióticos, onde o leite deve ser descartado para evitar resíduos no produto, representando cerca de 29 % do custo total da mastite clínica. O tratamento e mão de obra geram gastos com medicamentos e exames, correspondendo a aproximadamente 37% dos custos. O descarte precoce e mortalidade dos animais pode representar cerca de 28 % dos custos associados à mastite clínica (Carneiro et al., 2024).

Por outro lado, a mastite subclínica não apresenta sinais visíveis, sendo mais difícil seu diagnóstico e, em vista disso, sua prevalência se faz maior dentro dos rebanhos fazendo com que o animal permaneça na linha de produção (Massote et al., 2019). O diagnóstico é realizado por meio de testes laboratoriais como a CCS no leite e cultura microbiológica (Motta, 2015).

Os custos da mastite subclínica envolvem a redução na produção de leite, representando cerca de 48 % a 55 % do custo total da doença, também a qualidade do leite e bonificações, relacionados ao aumento na contagem de CCS devido à mastite

subclínica resultar em perda de bonificações pagas por qualidade (Gonçalves et al., 2021; Martinelli, 2024).

1.4. Classificação quanto a forma de contaminação

A mastite pode ser contagiosa, ocorrendo principalmente na forma subclínica da doença, ocorrendo o aumento da CCS do leite. Os patógenos são encontrados na pele da glândula mamária e nos tetos, assim, sua infecção ocorre através das mãos do ordenhador, dos equipamentos mal higienizados e de animal para animal (Massote et al., 2019). Segundo Arcanjo et al. (2017), a mastite contagiosa é a que mais causa problemas dentro da produção leiteira, com isso torna-se crucial sua profilaxia e controle o quanto antes. Já a mastite ambiental ocorre devido aos microrganismos do próprio ambiente em que o animal vive, como nas camas, bebedouros, cochos, entre outros. Diferente da mastite contagiosa, a mastite ambiental é mais frequente em quadros de mastite clínica. Pelo fato nos microrganismos estarem sempre presentes no ambiente, tornando o controle mais difícil dentro do rebanho (Rezende, 2017).

1.5. Patógenos causadores da mastite

Os principais agentes bacterianos responsáveis pela doença dividem-se em dois grupos epidemiológicos, sendo contagiosos: *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e ambientais: *Escherichia coli*, *S. uberis*. (de Almeida, 2020).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, em forma de cocos. Amplamente associada à mastite bovina, sendo resistente a diversos tratamentos e por sua capacidade de formar biofilme, além de produzir toxinas e enzimas, tornando-a fortemente adaptada a colonizar e invadir o tecido mamário e ambiente (Rainard et al., 2013). A infecção ocorre através dos tetos, onde a bactéria se fixa nas células epiteliais, colonizam e se multiplicam na glândula mamária. Caracterizada pela alta prevalência no índice de mastite nos rebanhos, seu tratamento é desafiador, uma vez que apresenta baixas taxas de cura, devido a sua elevada resistência aos antimicrobianos, sendo capaz de produzir enzimas que neutralizam o efeito de antibióticos como penicilinas e cefalosporinas (Langoni et al., 2017).

1.6. Diagnóstico de mastite

O diagnóstico precoce da mastite é de extrema importância, a fim de minimizar as perdas para o produtor, tornando o tratamento mais viável economicamente (Massote et al., 2019). O diagnóstico inicialmente pode ser realizado pelo exame de forma física, o qual é realizado a inspeção e palpação do úbere. Em seguida, pode-se realizar exames complementares que irão avaliar tanto o animal quanto o leite (Costa et al., 2013). Realizar testes rotineiros nas fazendas são importantes para monitorar o rebanho, a fim de evitar contaminação.

O teste da caneca do fundo preto é realizado antes da ordenha, com o intuito de verificar se o animal apresenta mastite clínica através da formação de grumos no leite e/ou sangue já nos primeiros jatos (Massote et al., 2019). O teste CMT, é importante para diagnóstico da mastite subclínica. Ele funciona através da adição de um reagente (CMT) ao leite da vaca, que reage com o DNA das células somáticas. Quanto maior a concentração de células somáticas, mais espessa fica o gel formado, diminuindo a presença e a intensidade da mastite (Massote et al., 2019).

Já CCS é um teste quantitativo realizado para avaliar a qualidade do leite e detectar mastite subclínica. As células somáticas consistem em leucócitos e células epiteliais descamadas do tecido mamário, onde o aumento dessas células indica caso de infecção na glândula mamária (Massote et al., 2019). Há um aumento de leucócitos e células epiteliais no leite, resultante da migração dessas células do sangue para o interior da glândula mamária em resposta à inflamação local. Em casos normais, o leite apresenta CCS menor que 100.000 cel/mL, enquanto a CCS de um quarto mamário infectado geralmente é superior a 200.000 cel/mL (Maiocchi et al., 2019).

Tabela 1. Contagem de células somáticas expressa em números de células por mililitros (células/mL)

CCS (células/mL)	Interpretação
<200.000	Normal, úbere saudável
200.000 – 500.000	Suspeita de mastite subclínica
>500.000	Indicativo de mastite subclínica

Fonte: Maiocchi et al., 2019.



Figura 1. A) Sinais clínicos de mastite clínica no leite B) Teste de contagem de células somáticas para detecção de mastite subclínica (Googles imagens; Arquivo próprio, 2023).

1.7. Métodos de controle e prevenção de mastite

A limpeza dos tetos após a ordenha, conhecida como *pós-dipping*, desempenha um papel essencial na remoção da película de leite que permanece no teto. Essa prática é direcionada principalmente ao controle da mastite contagiosa, especialmente causada por *S.aureus* e *S. agalactiae* (Campos et al., 2023). Essa prática consiste na imersão dos tetos dos animais em soluções desinfetante, as quais visam reduzir a carga microbiana presente nos tetos (do Brasil et al., 2012). Após a ordenha, os esfíncteres dos tetos permanecem abertos por um período, tornando-os vulneráveis à entrada de microrganismos e o uso de soluções desinfetantes no *pós-dipping*, podem eliminar bactérias presentes na pele dos tetos, prevenindo a colonização e entrada de agentes causadores de mastite (Radostits et al., 2007).

Convencionalmente nas propriedades são utilizadas soluções desinfetantes, compostas de iodo (0,7 % a 1,0%), clorexidina (0,5% a 1,0%) ou cloro (0,3% a 0,5%) no *pós-dipping* (da Silva Poló dos Anjos & Silva, 2021). Há relatos na literatura de que esses compostos podem deixar resíduos no leite causando efeitos nocivos à saúde humana (Schelles, 2021).

A resistência bacteriana tem se tornado uma ameaça crescente, especialmente nas propriedades lácteas, onde o tratamento da mastite é habitualmente baseado em antibióticos, favorecendo a formação de cepas resistentes (Peng et al., 2022). De acordo

com Oliver (2020), essa resistência pode levar a infecções, com evidências de que os antimicrobianos usados em animais de produção podem ser transferidos para humanos, seja pelo consumo de carne, leite e derivados contaminados com antibióticos de bactérias, ou por contaminação direta desses produtos.

Nesse cenário, a utilização de alternativas terapêuticas utilizando extratos de plantas tem sido estudada como compostos bioativos, capazes de inibir o crescimento de patógenos (Fernandes, 2009; Pozzo et al., 2011). Assim, o estudo de terapias alternativas em substituição aos antimicrobianos convencionais tem se mostrado promissores no controle da mastite (Silva Junior et al., 2020). Nesse contexto, a busca por agentes naturais para uso no pós-dipping visa substituir o iodo e outros produtos químicos, oferecendo alternativas seguras para a saúde humana e animal (Schelles, 2021). Em virtude das ponderações acima, torna-se necessário a buscar por alternativas terapêuticas não invasivas e que não causam resistência desses microrganismos (da Silva Junior et al., 2020; da Silva Junior et al., 2019).

1.8. Extratos Naturais e seus Compostos Bioativos na Prevenção de Infecções

O Brasil possui uma rica biodiversidade vegetal, porém grande parte ainda não foi explorada pela ciência. Entretanto nos últimos anos, pesquisas vêm sendo desenvolvidas avaliando as atividades farmacológicas, especialmente em ações anti-inflamatórias, analgésicas e antimicrobianas em diversas plantas (Maia, 2016; Correa, 2018). Entre as substâncias encontradas, destaca-se os polipeptídeos, terpenoides, alcaloides, compostos fenólicos, polifenóis e taninos (Pozzo et al., 2011; Rocha, 2019; Fanin et al., 2020). Segundo o estudo realizado por Silveira et al. (2023), a utilização de extratos de plantas (*Lafoensia pacari*; *Hymenaea* sp.; *Stryphodendron aadstringnes*) apresentou atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, diminuindo a incidência de mastite e melhoria da saúde animal. Ainda, a utilização de extratos vegetais se mostrou uma alternativa na redução microbiana dos tetos, em que, a partir da utilização de uma formulação composta de extratos naturais para uso como pós-dipping durante o manejo de ordenha, os autores observaram uma redução na carga microbiana no leite (Lopes et al., 2020).

1.9. Jurema-preta

Dentre os extratos utilizados, destaca-se a *Mimosa tenuiflora*, popularmente conhecida como “jurema-preta”. É uma planta nativa do semiárido brasileiro amplamente utilizada na medicina, pertencente à família *Fabaceae* e destaca-se por suas propriedades medicinais, químicas e ecológicas (Figura 1) (Santos et al., 2022).

A jurema-preta é rica em compostos bioativos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes e cicatrizantes. Entre esses compostos destaca-se os taninos com alto potencial antioxidante, atuando na cicatrização e na inibição de microrganismos, as saponinas contribuindo com suas propriedades anti-inflamatórias e antissépticas, os flavonoides como antioxidantes naturais, ajudando no combate ao estresse oxidativo e alcaloides (Alves et al., 2010). O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos e flavonoides pode estar relacionado à inibição das enzimas de bactérias e fungos e a complexação dos substratos dessas enzimas. A ação nas membranas celulares desses patógenos altera o metabolismo ou a incorporação dos taninos com íons metálicos, levando a redução desses elementos no metabolismo dos microrganismos (Santos & Melo, 2004).

A atividade antimicrobiana de extratos de plantas pode ser avaliada através de determinação de uma quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo testado. Esse valor é conhecido como concentração mínima inibitória (CMI). Assim, estudos vêm sendo realizados demonstrando o controle exercido pela ação da jurema-preta em relação a microrganismos causadores de mastite. Desse modo, um estudo realizado por Bezerra et al. (2009) demonstrou que a jurema-preta possuiu ação antimicrobiana frente a *S. aureus* isoladas de leite de vacas com histórico de mastite, confirmando o potencial do extrato para sua utilização como uma indicação terapêutica. Ainda, o extrato bruto da casca do caule de *M. tenuiflora* em cepas de *S. aureus*; e foi observado uma CIM de 0,18 mg/mL para 16 cepas e de 0,36 mg/mL para 14 cepas (Padilha et al., 2010). Já Soares (2015), testou o uso do extrato de *M. tenuiflora* na forma de pomada, como tratamento intramamário controla *S. aureus*, igualmente ao antibiótico cloranfenicol, na qual verificou efeito alternativo ao tratamento convencional.

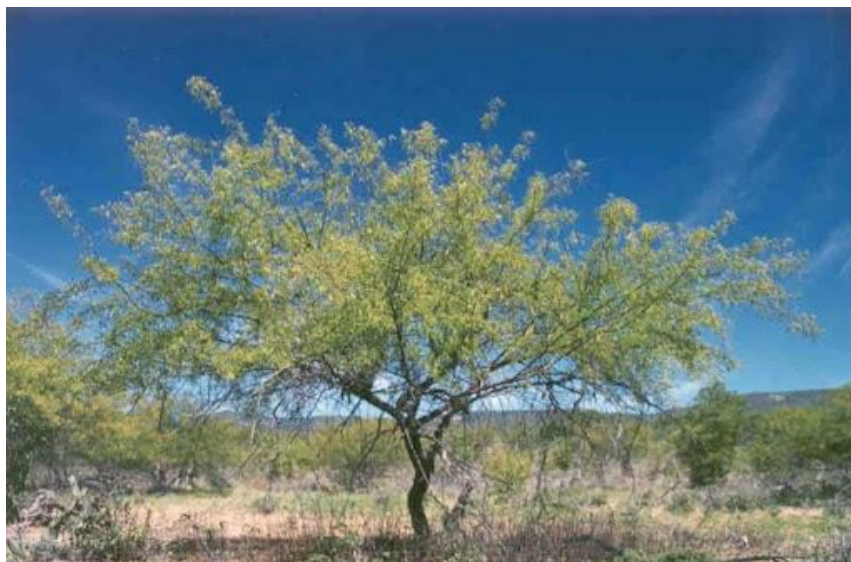


Figura 2. Ilustração da árvore da espécie jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) (Fonte: Google imagens).

1.10. Óleo de copaíba

O óleo de copaíba (OC) é um produto natural oriundo da seiva resinosa de árvores do gênero *Copaifera*. O óleo-resina de copaíba é obtido através de cortes na casca do caule de árvores encontradas no Sudeste e Centro-Oeste da América do Sul (Figura 2). Seu gênero compreende 72 espécies, onde 20 espécies existem no Brasil, dentre elas destacam-se *Copaifera duckei*, *C. glyricarpa*, *C. martii* e *C. reticulata* (Campanholi et al., 2022; Campanholi, Silva Junior, et al., 2022).

O OC é composto por diterpenos e sesquiterpenos, compostos bioativos que são responsáveis pelas propriedades terapêuticas do óleo. Alguns dos principais componentes incluem o β -cariofileno, o ácido copálico e o ácido caurenóico, os quais apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidante, analgésica, cicatrizantes e antissépticas (Anjos, 2020; Campanholi, Silva Junior, et al., 2022). Segundo Lima (2022), os principais ativos da copaíba são os sesquiterpenos e diterpenos, compondo cerca de 72% e 28% do óleo-resina, respectivamente.

As propriedades do OC vêm sendo, como: propriedades diuréticas, laxante, antídoto ao tétano, cicatrizante, inibidor de tumores e anti-inflamatória. O OC pode ser administrado por via oral ou utilização tópica, na qual seus efeitos terapêuticos podem variar de acordo com a espécie de copaíba (Rodrigues; Souza, 2017; Leite et al., 2023). Pesquisa realizada por Palheta et al. (2017), foi demonstrado *in vitro* e *in vivo*, resultados promissores, indicando que o OC pode acelerar o processo de cicatrização,

promovendo a regeneração tecidual. Esse efeito de cicatrização é atribuído à ação antioxidante do óleo protegendo as células da pele contra o estresse oxidativo.

De acordo com Lima (2022), o óleo-resina de copaíba é um antibiótico natural eficaz contra bactérias Gram-positivas, sendo amplamente utilizado como cicatrizante e anti-inflamatório no tratamento de infecções. O óleo resina de *C. multijuga* apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *E. coli* (ATCC-25922), *S. aureus* (ATCC-25923), e *P. sedomonas aeruginosa* (ATCC-9027) (Mendonça; Onofre, 2009). Outro estudo realizado por Pacheco et al. (2006), avaliaram a atividade do óleo-resina de copaíba de diferentes árvores contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, onde constataram inatividade das amostras contra as Gram-negativas.



Figura 3. Extrativismo do óleo de copaíba, proveniente da árvore de copaíba (Fonte: Google imagens).

1.11. *Chlorella vulgaris*

Outro extrato vegetal demonstra propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatória é microalga *Chlorella vulgaris* (Sedighi et al., 2016) (Figura 3). A *C. vulgaris* é uma microalga verde pertencente à família *Chlorophyta*, unicelular de água doce, conhecida por suas propriedades nutricionais e terapêuticas (Richmond, 2004).

A *Chlorella* tem despertado interesse em estudos pelo fato dela ser um fotossensibilizador utilizado em terapias fotodinâmicas, devido à presença de compostos bioativos que absorvem luz em determinados comprimentos de onda. Rica em carotenóides e clorofila, a *Chlorella* é capaz de liberar oxigênio por meio da fotossíntese e gerar biomassa para alimentação, compostos úteis e combustível (Markou & Nerantzis,

2013). Elas capturam a luz solar absorvendo dióxido de carbono como alimento principal (Mata et al., 2010). Essa microalga tem atraído interesse em diversas aplicações biomédica, como seu potencial fotossensibilizador em terapias fotodinâmicas (TFD). A *Chlorella vulgaris* possui compostos bioativos como as porfirinas, que são fotossensíveis, na qual quando irradiadas com luz geram espécies reativas de oxigênio (EROs) sob luz visível ou infravermelho; além de conter polifenóis e outros antioxidantes (Almalki et al., 2022). A utilização de composto fotossensíveis foi eficaz em testes antimicrobianos, inibindo o crescimento das bactérias patogênicas da mastite (Silva Junior et al., 2020).



Figura 4. Extrato de microalga *Chlorella vulgaris* (Fonte: Google imagens).

1.12. Emulgel como sistema de liberação tópica

O desenvolvimento de emulgéis vem ganhando destaque como sistemas terapêuticos promissores. Esses sistemas de aplicação tópica apresentam diversas propriedades de emulsões e géis, na qual proporciona benefícios para aplicação em animais. Sua capacidade de melhorar a estabilidade, a penetração e a eficácia de agentes terapêuticos, tornando-o ideal para o tratamento de infecções e inflamações em tecidos externos, como o úbere (Khullar et al., 2012).

Sua estrutura é uma combinação de óleo em água ou água em óleo, com uma base de gel, resultando em um sistema estável, permitindo a liberação gradual de princípios ativos. A presença de emulsificantes e agentes gelificantes como o Carbopol, facilitam a penetração de compostos bioativos na pele ou tecido-alvo. Essa característica é essencial para o tratamento de infecções ou inflamações em camadas mais profundas da

pele, na qual apresentam forma agradável, alta capacidade de penetrar a pele, sem gordura, facilidade de aplicação e remoção, podem apresentar comportamento toxotrópico, emoliente e possuem vida útil mais longa (Varma, 2014; Jadale; Pawaw, 2017). A textura semissólida permite espalhabilidade uniforme, maximizando o contato dos princípios ativos com a área tratada. Essa propriedade é especialmente relevante em regiões de difícil acesso ou em animais que se movimentam constantemente.

O emulgel é ideal para incorporar extratos naturais, como OC e extratos vegetais, que possuem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias amplamente exploradas no tratamento da mastite bovina. Estudos evidenciam que emulgéis contendo OC apresentam boa adesividade, capacidade de penetração dérmica e atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, onde o OC apresentou uma contagem total de *S. aureus* de log 7,46 UFC/mL, apresentando redução de duas unidades logarítmicas em relação ao controle positivo, que apresentou contagem de log 9,62 UFC/mL. (Campanholi et al., 2022

1.13. Aplicação de terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD é uma técnica terapêutica, minimamente invasiva e tem mostrado resultados promissores para o tratamento de lesões. A técnica consiste na interação entre uma luz de comprimento de onda específico, um fotossensibilizador e oxigênio molecular presente nos tecidos, na qual induzem a formação de EROs, como o oxigênio singlete (Campanholi et al., 2018).

O seu tratamento consiste na administração de um fotossensibilizador no local-alvo, como porfirinas, clorinas e/ou clorofilas. A irradiação com luz de comprimento de onda específico ativa o fotossensibilizador, onde ele transfere energia para o oxigênio molecular presente nos tecidos, formando espécies reativas que causam danos a estrutura celular, levando à morte celular ou eliminação de microrganismos (Campanholi et al., 2018). A TFD tem mostrado potencial em aplicações na medicina veterinária e na produção animal, onde o tratamento de infecções microbianas resistentes, como no manejo da mastite bovina, na redução de biofilmes bacterianos em superfícies de pele e mucosa e na substituição de antimicrobianos convencionais, minimizando o risco de resistência bacteriana (Silva, 2009; Li et al., 2024).

A sinergia entre a TFD, extratos naturais e sistemas de liberação como os emulgeis, para aplicações antimicrobianas e terapêuticas, vem se destacando no ramo da pesquisa. O uso de OC, por exemplo, como parte de um sistema terapêutico combinado com TFD, tem mostrado resultados promissores devido às suas propriedades antimicrobianas naturais, que são ampliadas pela ação fotodinâmica. Estudos utilizando a TFD combinada com géis termorresponsivos contendo curcumina, Safranina e extratos de clorofila aplicados como pós-*dipping*, onde apresentou eficácia na redução de microrganismos *in vitro* e *in vivo*. A TFD, aliada a formulações como hidrogéis fotoativos, se apresenta como alternativa sustentável aos antibióticos, reduzindo impactos ambientais e resíduos no leite, além de ser economicamente viável. A iluminação com LEDs de baixo custo é uma das estratégias mais utilizadas (da Silva Junior et al., 2019).

A substituição de tratamentos convencionais por propostas baseadas na TFD associada a extratos naturais possui potencial, mostrando eficácia antimicrobiana (Songca, 2023). Além da utilização de extratos naturais, como de jurema-preta e OC, que possuem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, na qual aliados a TFD, aumentam a eficácia do tratamento. Essa sinergia pode reduzir a dependência de antibióticos e minimiza o risco de resíduos químicos no leite (Li et al. 2024).



Figura 5. Terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a emulgel de extrato de jurema-preta, *Chlorella vulgaris* e óleo de copaíba no pós-dipping em vacas leiteiras (Arquivo próprio, 2024).

2. Minerais

Minerais são elementos químicos cruciais no metabolismo de animais, desempenhando papel importante na composição de estruturas biomoleculares, na regulação do crescimento e manutenção de tecidos, na atuação como cofatores enzimáticos, na ativação de ações hormonais e no controle da pressão osmótica e do equilíbrio ácido-base. Apesar de representarem 5% do peso total do corpo, podem influenciar diretamente a produtividade do sistema, seja positivamente ou negativamente (Filappi et al., 2005). Eles são classificados em duas categorias, os macrominerais como cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl), magnésio (Mg) e enxofre (S), necessários em grandes quantidades, e os microminerais, sendo zinco (Zn), cobre (Cu), selênio (Se), iodo (I), ferro (Fe), manganês (Mn) e cobalto (Co), necessários em pequenas quantidades (NASEM, 2021). Na alimentação, os minerais são encontrados em plantas e forragens, sendo a principal fonte natural, também na água e na suplementação através da inclusão em rações para corrigir deficiências.

2.1. Minerais e o sistema imunológico

O sistema imunológico é um dos sistemas mais importantes do organismo animal, pois compreende todos os mecanismos pelos quais o organismo se defende de invasores externos, como fungos, vírus, bactérias e protozoários, também protege o corpo contra células defeituosas (Tizard, 2002). O adequado funcionamento do sistema imune garante aos animais maior resistência às doenças, e melhor desempenho produtivo. Sabe-se que determinados nutrientes da dieta possuem efeito sobre a resposta imunológica e podem aumentar os mecanismos de defesa. Os elementos minerais desempenham um papel importante neste aspecto.

2.2. Selênio

O selênio é um micromineral essencial que desempenha papel na saúde imunológica e antioxidante das vacas leiteiras, especialmente na prevenção da mastite. O

selênio age protegendo a célula no processo de degeneração celular em conjunto com a vitamina E (Ishler et al., 1997). É necessário a utilização de selênio para a produção da enzima glutathione peroxidase, que é responsável por neutralizar radicais livres gerados durante o metabolismo, reforçando a defesa antioxidante do organismo. A sua deficiência está associada a uma redução na capacidade imunológica, tornando os animais mais susceptíveis a infecções uterinas, mastite e retenção de placenta (McDonald et al., 1993).

A absorção do selênio ocorre no duodeno, e sua excreção acontece principalmente via urina e fezes. Porém, seu excesso pode causar claudicação, deformações no casco e levar até a morte por insuficiência respiratória (Andriguetto et al., 1990). McDowell (2002) cita o decréscimo na capacidade bactericida do sistema imune com a ocorrência de deficiência de selênio. Desta forma, o equilíbrio entre a deficiência e o excesso é crucial para a saúde e a produtividade dos animais.

2.3. Cobre

O cobre participa desempenhando funções essenciais no organismo, como a formação óssea, auxiliando no desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, função no sistema nervoso e cardiovascular, contribuindo para a manutenção da integridade do sistema nervoso, participa da síntese de colágeno, hemoglobina, melanina e aminas, atua na queratinização, desempenha papel crucial no sistema antioxidante por meio das enzimas ceruloplasmina e CuZn SOD (superóxido dismutase cobre-zinco), sendo fundamental para a defesa da glândula mamária contra infecções (Larvor, 1983; McDowell, 1992; McDonald et al., 1993). Utilização de fontes quelatadas de cobre é interessante devido à sua capacidade de reduzir interações com antagonistas (McDowell, 2003).

O cobre se acumula no fígado, cérebro, rins, coração, sendo o fígado o principal local de armazenamento em ruminantes (McDowell, 1992). A sua absorção ocorre no duodeno e sua excreção ocorre principalmente pelas fezes. O excesso de cobre ocorre principalmente devido ao acúmulo no fígado, levando a perda de apetite, icterícia, lesão hepática e até a morte (McDonald et al., 1993; Ishler et al., 1997).

2.4. Zinco

O zinco desempenha papel essencial no metabolismo, como componentes de diversas metaloenzimas, como anidrase carbônica, fosfatase alcalina e DNA polimerase. Este mineral também está envolvido em processos como queratinização, participa da molécula de insulina e é crucial para o funcionamento do olfato e do paladar. O zinco também participa do mecanismo de liberação da vitamina A no fígado, mostrando sua influência imunológica (Larvor, 1983). Na defesa da glândula mamária contra infecções, o zinco está ligado ao mecanismo de reconstrução da queratina presente no canal do teto entre as ordenhas, além do seu envolvimento com o metabolismo oxidativo, sendo também essencial para manter a integridade da pele, primeira linha de defesa deste órgão (Paschoal, 2013).

O zinco é absorvido no abomaso e no intestino delgado em ruminantes, e excretado principalmente pelas fezes (McDowell et al. 1977). A deficiência do zinco pode acarretar problemas como menor capacidade de fagocitose pelos macrófagos, atrofia do baço e do timo, órgãos essenciais para o sistema imunológico. Sua deficiência também está associada a problemas, como menor ganho de peso, redução da eficiência alimentar, dificuldades de cicatrização, inflamações oculares e estreitamento articular (McDonald et al., 1993; Ishler et al., 1997). Já o excesso de zinco pode interferir na absorção de cobre, reduzindo o consumo voluntário de alimentos pelos animais McDonald et al. (1993).

2.5. Minerais Quelatados

Os minerais quelatados ou orgânicos foram introduzidos no final da década de 1970, surgindo como uma fonte de suplemento mineral, com potencial de aprimorar o desempenho dos animais (Kiefer, 2005). Eles são formas de minerais em que o íon mineral (zinco, ferro, cobre ou magnésio) se liga a moléculas orgânicas, formando um anel de ligação. Essa ligação entre o mineral e a substância orgânica protege o mineral durante o trânsito digestivo, melhorando sua absorção e biodisponibilidade. Isso ocorre porque a estrutura do mineral quelatado impede que ele reaja com outros compostos da dieta que poderiam reduzir sua absorção, como fitatos ou fibras, resultando em uma maior eficiência de utilização pelo organismo (NRC, 2021).

A forma quelatada destes minerais (selênio, cobre e zinco) via suplementação é mais eficiente, pois é mais absorvida. Isso evita perdas que podem ocorrer com as formas inorgânicas (Paschoal et al., 2003). A absorção dos minerais quelatados pode

ocorrer sob duas formas: o mineral pode ser ligado à borda em escova sendo absorvido pela célula epitelial ou como ocorre na maioria das vezes, onde o agente quelante é absorvido levando junto a si o metal (Kiefer, 2005).

2.6. Importância dos minerais quelatados

Na nutrição de vacas leiteiras, os minerais quelatados vem ganhando destaque devido aos seus benefícios em termos de absorção, biodisponibilidade e impacto positivo na saúde e produtividade animal. Com isso, apresentam características superiores às fontes inorgânicas tradicionais (McDowell, 2003).

A suplementação com cobre, zinco e selênio em dietas de vacas leiteiras durante o período seco e de lactação ajudam a melhorar a resistência às infecções mamárias e resultaram em menores taxas de mastite clínica e subclínica e em aumento da qualidade do leite (Bhandari et al., 2013; Zigo et al., 2021). Além disso, o uso de minerais quelatados como cobre, zinco e selênio pode ser benéfico na melhoria da resposta imunológica de vacas, reduzindo a gravidade das infecções e melhorando a saúde do úbere, onde minerais quelatados demonstraram aumentar a biodisponibilidade dos microminerais, reduzindo as taxas de mastite ao melhorar a função imunológica, proteção antioxidante e integridade do tecido do úbere. Ainda, a utilização de minerais quelatados (cobre, manganês, zinco e ferro) resultou em maior absorção e menor excreção em comparação com formas inorgânicas. Isso contribui para uma melhoria no sistema imunológico e na redução de inflamações, incluindo a mastite (Mottin et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almalki, M. A., Khalifa, A. Y. Z., Alkhamis, Y. A. (2022). Antibiose *in vitro* do extrato de *Chlorella vulgaris* contra o fitopatógeno *Stenotrophomonas maltophilia*. J Pure Appl Microbiol. ;16(1):630-637. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.1.64>.
- Almeida, P. V., Neto, A. C., de Souza Figueiredo, E. E., & Carvalho, R. C. T. (2020). Micro-organismos Isolados de Mastite Bovina e em Leite Cru no Brasil. UNICIÊNCIAS, 24(1), 58-64.

- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33, 2202-2210. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>.
- Andrieu, S. (2008). Existe um papel para suplementos de oligoelementos orgânicos na saúde de vacas em transição?. *The Veterinary Journal*, v. 176, n. 1, p. 77-83.
- Andriguetto, P. C., Coelho, I. C. M., Mendonça, C. T., Ribeiro, A., & Artigas, G. V. (1990). Fístulas enterocutâneas: complicações. *GED gastroenterol. endosc. dig*, 29-32.
- Anjos, Débora Juliana dos. (2020) Caracterização de diferentes óleos de copaíba e avaliação da propriedade cicatrizante. Campinas, SP: [Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas].
- Arcanjo, A. H. M., Oliveira, P. C. S., Moreira, L. C., Jayme, C. G., Soares, N. A., Oliveira, A. R., Pereira, K. A., & Nogueira, M. A. R. (2017). Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. *Global Science and Technology*, 10(1).
- Azooz, M.F., El-Wakeel, S.A e Yousef, H.M. (2020). Análises financeiras e econômicas do impacto da mastite bovina na lucratividade das fazendas leiteiras egípcias. *Mundo Veterinário*, 13(9), 1750–1759. [10.14202/vetworld.2020.1750-1759](https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1750-1759).
- Benedette, M. F., Silva, D., Rocha, F. P., C. Santos, D. A. N., Costas, E. A. A. (2008). Mastite bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 7, n. 11, p. 1-5.
- Bezerra, D. A., Pereira, A., Lôbo, K., Rodrigues, O. G., Athayde, A. C., Mota, R. A., & Rodrigues, S. C. (2009). Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 814-817.
- Bhandari, B. M., Garg, M. R., & Sherasia, P. L. (2013). Effect of supplementing chelated trace minerals and coated vitamins on the incidences of sub-clinical and clinical mastitis in dairy cows. *Livestock Research for Rural Development*, 25, 4.
- Borges L.E.M., Paschoal J.J. (2013). Influência dos micro-minerais (Cu, Mn, Se e Zn) no sistema imunológico dos bovinos. *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU*, v.3.

- Caliman, M. F.; Gasparotto, P. H. G.; Ribeiro, L. F. (2023). Principais impactos da mastite bovina: Revisão de literatura. *Getec*, V.12, n.37, p.91-102.
- Campanholi, K. d. S. S., da Silva Junior, R. C., Braga, G., de Moraes, F. A. P., & Balbinot, R. B. C., Wilker (2022). Minireview about Medicinal Copaiba Oil in the Treatment of Skin Diseases. *Journal of Dermatology and Skin Science*, 4(1), 1-6.
- Campanholi, K. d. S. S., Gonçalves, R. S., da Silva, J. B., dos Santos, R. S., de Oliveira, M. C., de Souza Ferreira, S. B., Baesso, M. L. (2022). Thermal stimuli-responsive topical platform based on copaiba oil-resin: Design and performance upon *ex-vivo* human skin. *Journal of Molecular Liquids*, 361, 119625.
- Campanholi, K. D. S. S., Junior, R. C. D. S., Moraes, F. A. P. D., Gonçalves, R. S., Rodrigues, B. M., Pozza, M. S. D. S., & Caetano, W. (2023). Emulsão à base de óleo de copaíba como agente quimioterápico natural para tratamento de mastite bovina: estudos *in vivo*. *Farmacêutica*, 15 (2), 346.
- Campanholi, K. d. S. S., Silva Junior, R. C. d., Gonçalves, R. S., Bassi da Silva, J., Pedroso de Moraes, F. A., Said dos Santos, R., Bruschi, M. L. (2022). Design and Optimization of a Natural Medicine from *Copaifera reticulata* Ducke for Skin Wound Care. *Polymers*, 14(21), 4483.
- Campanholi, K. D. S., Braga, G., da Silva, J. B, da Rocha, N. L, de Francisco, L. M, de Oliveira, E. L., & Caetano, W. (2018). Desenvolvimento de plataforma biomédica de extrato à base de clorofila para terapia fotodinâmica tópica: propriedades mecânicas e espectroscópicas. *Langmuir*, 34 (28), 8230-8244.
- Campos, J. V. F., Albuquerque, L. C. C. L., Porto, K. C. O., Oliveira, J. R. A., Fontes, G. P., Santos, P. A. B., & Acurcio, L. B. (2023). Aspectos relacionados com a etiologia da mastite bovina: uma revisão de literatura: Uma revisão de literatura. *Conexão Ciência (Online)*, 18(3), 71-88.
- Carneiro, AV, Stock, LA, Oliveira, VM, Zoccal, R., Carvalho, GR, MARTINS, PDC, ... & Luiz Carlos Takao Yamaguchi, EGD (2024). Mastite clínica: prevalência e custo de tratamento em rebanho leiteiro.
- Cheng, W. N., Han, S.G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments- A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33(11):1699-1713.

- Costa, C. R. de M., Feitosa, M. L. T., Pessoa, G. T., Bezerra, D. O., Ferraz, M. S., & Carvalho, M. A. M. (2013). Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: revisão de literatura. PUBVET, 7, 619–706.
- Demeu, F. A.; Lopes, A. M.; Magalhães, C. M. B.; Costa, M.; Santos, G.; Franco Neto, A. (2015). Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. Rev. Ceres, Viçosa, v. 62, n.2, p. 167-174.
- Dirksen, G., Gründer, H. D., & Stöber, M. (1993). Rosenberger, exame clínico dos bovinos.
- EMBRAPA. Anuário leiteiro 2023. Edição Digital. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/publicacao/1154264/anuario-leite-baixo-carbono>. Acesso em: 27/02/2024.
- Essa, B.; Al-Sharif, M.; Abdo, M.; Fericean, L.; Ateya, A. (2023). New Insights on Nucleotide Sequence Variants and mRNA Levels of Candidate Genes Assessing Resistance/Susceptibility to Mastitis in Holstein and Montbéliarde Dairy Cows. Journals Veterinary Sciences. V. 10. Issue 1. 10.3390/vetsci10010035.
- Fanin, M., Fanin, É. L. B. B., dos Santos, I. C., de Lima, J. S., Gonçalves, A. P. P., & de Almeida Martins, L. (2020). Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Medicina Veterinária, 14(1), 24-32.
- Fernandes, F. C. (2009). Avaliação do potencial antimicrobiano do decocto da folha do cajá (*Spondias mombin* L.) na prevenção da mastite bovina. Mossoró: Universidade Federal Rural do SemiÁrido.
- Filappi, A., Prestes, D., Cecim, M. (2005). Suplementação mineral para bovinos de corte sob pastejo - revisão. Veterinária Notícias, v. 11, n. 2, p. 91-98.
- Gonçalves, J. L.; Freu, G., Garcia, B. L. N., Santos, M. V. (2021). Impacto da mastite subclínica bovina sobre a produção de leite e o retorno econômico.
- Ishler, V., Heinrichs, J., Varga, G. (1997). From feed to milk: Understanding rumen function. University Park: PennState, College of Agricultural Sciences. 27p. (Extension Circular, 422).
- Jagdale, S., Pawar, S. (2017). Gllified emulsione f ofloxacin for transdermal drug delivery System. Adv Pharm Bull, v. 7, n.2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527237/>. Acessado em: 08/12/2024.

- Khullar, R., Kumar, D., Seth, N., & Saini, S. (2012). Formulação e avaliação de emulgel de ácido mefenâmico para administração tópica. *Revista farmacêutica saudita*, 20 (1), 63-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.001>.
- Kiefer, C. Minerais quelatados na nutrição de aves e suínos. (2005). *Revista Eletrônica Nutritime*, v.2, nº3, p.206 –220.
- Langoni, H., Salina, A., Oliveira, G. C., Junqueira, N. B., Menozzi, B. D., Joaquim, S. F. (2017). Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(11):1261-1269, Botucatu – SP.
- Langoni, H., Salina, A., Oliveira, G. C., Junqueira, N. B., Menozzi, B. D., & Joaquim, S. F. (2017). Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>.
- Larvor, P. The pools of cellular nutrients. In: RIIS, P.M. *Dynamic biochemistry of animal production*. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.281-318.
- Leite, Alanna Mylla Costa; Oliveira, Josuel Carlos; Pinheiro, Eusilene Estrela; Soares, Thaís Michele Lopes; Rodrigues, Lurdilene Ribeiro; Estrela, Rafaelle Dias; Boaz, Cidiane De Jesus Lopes. (2023). O uso de plantas medicinais associadas ao tratamento de leishmaniose em pacientes atendidos na regional de saúde do município de Pinheiro-MA. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 5, e18612541681.
- Li Yijun, Huang Shan, Du Jingyun, Wang Shaofeng, Cai Zhiyu, Huang Xiaojing. (2024). Deciphering the killing mechanisms of potassium iodide in combination with antimicrobial photodynamic therapy against cross-kingdom biofilm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v,14.
- Lima, Meyrelle Figueiredo. (2022). Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de emulsões cosméticas contendo óleo de copaíba (*Copaifera Officinalis L*). 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- Lopes, T. S., Fontoura, P. S., Oliveira, F. A., Rizzo, F. A., Silveira, S., Streck, A. F. (2020). Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis, *Research in Veterinary Science*, V. 131. p. 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>. 2020.

- Maiochi, R., Rodrigues, R., & Wosiacki, S. (2019). Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. *Enciclopédia Biosfera*, 16(29), 1237–1251. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2019A104.
- Maisch, T. (2015). Resistance In antimicrobial photodynamic activation of bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(8), 1518-1526.
- Markou G., Nerantzis E. (2013). Microalgas para compostos de alto valor e produção de biocombustíveis: uma revisão com foco no cultivo sob condições de estresse. *Biotechnology Advances* 31: 1532 – 1542.
- Martinelli, M. E. R. (2024). Custo da mastite em rebanhos leiteiros: uma revisão narrativa.
- Massote, V. P., Zanateli, B. M., Alves, G. V., Gonçalves, E. S., & Guedes, E. (2019). Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. *Revista Agroveterinária Do Sul de Minas*, 1(1), 41–54.
- Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. (2010). Microalgas para produção de biodiesel e outras aplicações: uma revisão. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217 – 232.
- Mcdonald, P., Edwards, R. Greenhalgh, J.F.D. (1993). *Nutricion animal*. 4.ed. Zaragoza: Acribia. 571p.
- Mcdowell, L. R. (1986). *Minerais para ruminantes em pastejo em regiões tropicais*. Gainesville, FL: Universidade da Flórida. 90p.
- Mcdowell, L. R. (1992). *Minerals in animal and human nutrition*. New York: Academic Press. 524p.
- Mcdowell, L. R. (2002). Recent advances in minerals and vitamins on nutrition of lactating cows. *Pak. J. Nutr.*, v.1, p.8-19.
- Mcdowell, L. R. (2003). *Minerals in animal and human nutrition*. 2. ed. Netherlands: Elsevier Science. 644 p.
- McDowell, L. R., Conrad, J. H., Thomas, J. E., Harris, L. E., & Fick, K. R. (1977). Composição nutricional de forragens latino-americanas. *Tropical Animal Production*, 2 (3), 273-279.
- Mendonca, D.E., Onofre, S.B. (2009). Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba - *Copaifera multijuga Hayne (Leguminosae)*. *Rev. Bras. Farm.*, v.19, n.2b, p.577-581.

- Motta, R. G. (2015). Eficácia do *ceftiofur* no tratamento estendido Intramamário da mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas. Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu.
- Mottin, C., do Prado, I. N., Chefer, D. M., Eiras, C. E., & Rivaroli, D. C. (2013). Suplementação com minerais quelatados em bovinos: uma revisão. *Revista Campo Digital*, 8(2).
- National Research Council. (2021). Nutrient requirements of dairy cattle (8th ed.). National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine.
- Neiva, R. (2018). Nanotecnologia: trata mastite e muito mais. *Anuário Leite*, São Paulo, 72–73.
- Nogueira, F. R. B., Souza, B. B., Carvalho, M. G. X., Junior, F. G., Marques, A. V. M. S., & Leite, R. F. (2013). Termografia infravermelha: uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de mastite em ovelha. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 35(3), 289–297.
- Oliver, J. P., Gooch, C. A, Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J. J., Sassoubre, L., & Aga, D. S. (2020). Revisão convidada: Destino de resíduos de antibióticos, bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência a antibióticos em sistemas de gerenciamento de esterco de laticínios dos EUA. *Journal of dairy science*, 103 (2), 1051-1071.
- Pacheco, T. A., Barata, L. E., Duarte, M. C. (2006). Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera spp*) balsams. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.8, p.123-124.
- Padilha, I. Q., Pereira, A. V., Rodrigues, O. G., Siqueira-Júnior, J. P., & Pereira, M. D. S. V. (2010). Atividade antimicrobiana de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. do Nordeste do Brasil contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 45-47.
- Palheta, C. D. S. A., da Silva, P. R. G., de Oliveira, A. C. M., Silva, A. M. F., Dantas, D. R., Duarte, T. B., & Silva, L. M. (2018). Efeitos da andiroba associada ao microagulhamento na pele de ratos. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, 10(4), 323-326.

- Paschoal, J. J., Zanetti, M. A., & Cunha, J. A. (2003). Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(3), 249-255.
- Pedersen, R.R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., & Jørgensen, E. (2021). Pesquisa de biofilme em mastite bovina. *Frontiers in veterinary Science*, 8, 656810.
- Peng, J., Lu, Q., Liu, X., Deng, Y., Shang, T., Yuan, L., Zhang, H., & Zeng, Q. (2022). Efeito antibacteriano do lipopeptídeo ultracurto sintético em *Streptococcus agalactiae* e é ativo na mastite bacteriana em camundongos. *Comunicações de Pesquisa Bioquímica e Biofísica*, 601, 153–159. [10.1016/j.bbrc.2022.02.061](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.061).
- Peters, Mônica Daiana de Paula. (2012). Avaliação da mastite e seu impacto sobre a sensibilidade à dor em vacas leiteiras.
- Pozzo, M. D. et al. (2011). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp.* isolados de mastite caprina. *Ciênc. Rural*, v.41, n.4, p.667-672.
- Radostits, O.M., Gay, C. C., Hinch Cliff, Kw., Constable, Pd **VeterMedicina Veterinária: Um Manual de Doenças de Bovinos, Equinos, Ovinos, Porcos e Caprinos*. 10ª edição.
- Rainard, P., Corrales, J. C, Barrio, M. B., & Cochard, T. (2013). "Mastite por *Staphylococcus aureus* em gado leiteiro: diversidade de linhagens, patogênese, evasão imunológica e estratégias de controle." *Journal of Dairy Science*, 96(6), 5605–5620.
- Ribeiro, E. C. B., Pereira, C. A., Bezerra, M. D. A., Sampaio, N. I. S., & Carvalho, P. F. S. (2022). Sistema agroindustrial do leite no Maranhão: uma análise prototípica. *Revista De Economia E Sociologia Rural*, 60[4], e240762. <https://doi.org/10.1590/1806-9479.2021.240762>.
- Richmond, A. (2004). Manual de cultivo de microalgas: biotecnología y ficología aplicada (Vol. 577).
- Rocha, C., Burlandy, L., & Magalhães, R. (Eds.). (2013). Segurança alimentar e nutricional: perspectivas, aprendizados e desafios para as políticas públicas. Editora Fiocruz. Obtido em <https://books.scielo.org/id/78c7c>.
- Rocha, R. R. (2019). Estudo comparativo sobre a composição química, atividade microbiana e efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Croton tetradenius Baill.* e *C. pulegioidorus*

- Baill.*, contra isolados de *Staphylococcus aureus*. Sobral: Universidade Federal do Ceará.
- Rodrigues, R.C.; Souza, J.B.B. (2017). Utilização do óleo de copaíba no tratamento e cicatrização de lesões. *Revista Interdisciplinar de Ciências Médicas –Anais*.
- Santos, R. F, Santos, A. P., Oliveira, L. B., Ferreira, T. C. (2022). Antimicrobial Properties of jurema-preta (*mimosa tenuiflora (wild.) poir*) pear extractos. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.8, n. 3, p. 16915-16930.
- Santos, S. C., Mello, J. C. P. Taninos. In: Simões, C. M. O. Et al. (2004). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 615 656.
- Schelles, J. L., Rodrigues, B. M., dos Santos Pozza, M. S., & de Lima, L. S. (2021). Uso de extrato de própolis como agente antisséptico para pré e pós dipping em vacas leiteiras. *Agrarian*, 14(51), 95-101.
- Schvarz, D. W.; Dos Santos, J. M. G. (2012). Mastite Bovina em Rebanhos Leiteiros: Ocorrência e Métodos de Controle e Prevenção. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 5, n. 3.
- Sedighi, Mahsa et al. (2016). Potenciais efeitos na saúde dos hidrolisados de proteínas enzimáticas de *Chlorella vulgaris*.
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, MB, Iqbal Yatoo, M., Patel, SK, Karthik, K., Khurana, SK, Singh, R., Puvvala, B., Singh, R., Singh, KP, & Chaicumpa, W. (2021). Avanços nas abordagens terapêuticas e gerenciais da mastite bovina: uma revisão abrangente. *Veterinária Trimestral*, 41(1), 107–136.10.1080/01652176.2021.1882713.
- Silva Junior, R. C., Campanholi, K. D. S. S., de Moraes, F. A. P., dos Santos Pozza, M. S., dos Santos, G. T., Hioka, N., & Caetano, W. (2019). Development and applications of safranin-loaded Pluronic® F127 and P123 photoactive nanocarriers for prevention of bovine mastitis: *In vitro* and *in vivo* studies. *Dyes and Pigments*, 167, 204-215.
- Silva Junior, R. C., Campanholi, K., Moares, F. A. P., Dos Santos Pozza, Magali Soares., Hoshino, L. C., Baesso, M., Silva, J. B., Bruschi, M., Caetano, W. (2020). Photothermal stimuli-responsive hydrogel containing Safranin for mastitis treatment in veterinary using phototherapy. *ACS Applied Bio Materials*. v.1, p.1 - 10.
- Silva Poló, T., dos Anjos, G. T., & da Silva, S. C. (2021). Perfil dos produtores e da produção de leite da região de Araçatuba/SP frente à mastite bovina the livelihood of

- dairy producers and milk production in the region of the city of Araçatuba/SP regarding bovine mastitis. *Brazilian Journal of Development*, 7(9), 86964-86974.
- Silva, J.L.S.; Garcia, R.; Saibro, J.C. (1996). Desenvolvimento de bovinos e seus efeitos sobre árvores em florestas de eucalipto (*Eucalipto saligna*) na região fisiográfica da Depressão Central no RS. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSISTEMAS FLORESTAIS: FOREST'96, 4., 1996, Belo Horizonte. Resumos... Belo Horizonte: BIOSFERA. p.211-2.
- Silva, Livia Helena Moreira da. (2009). Tratamento de mastite subclínica utilizando Terapia Fotodinâmica (PDT). 65 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Silva, R. C., Pelissari, K. P., Moraes, F. A. P., Scapim, M. R. S., Valenciano, F. G., Perez, H. L., & Campanholi, K. S. (2024). Potencial de um emulgel fitoterápico composto por *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Copaifera martii* para cicatrização tópica de feridas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 44, e 07354.
- Silva-Junior, R. C., Campanholi, K. d. S., de Moraes, F. v. A., Pozza, M. S. d. S., de Castro-Hoshino, L. V., Baesso, M. L., Caetano, W. (2020). Photothermal stimuli-responsive hydrogel containing safranin for mastitis treatment in veterinary using phototherapy. *ACS Applied Bio Materials*, 4(1), 581-596.
- Silveira, A. V. B. A., Bueno, F. A. Zaiden, L., Ventura, G. F., Souza, C. M., Stella, A. E. (2023). Sensibilidade de bactérias causadoras de mastite bovina a extratos de plantas nativas do cerrado. *Veterinária e Zootecnia*. V. 30.
- Soares, L. M. A.(2015). Extrato da jurema preta como alternativa aos antimicrobianos no controle da mastite bovina. Dissertação (Mestrado) – Universidade Brasil, Brasília.
- Songca, S.P. (2023). Combinações de terapia fotodinâmica com outras tecnologias terapêuticas minimamente invasivas contra câncer e infecções microbianas. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (13), 10875. <https://doi.org/10.3390/ijms241310875>.
- Tizard, I. (2002). A resposta de anticorpos aviários. Em *Seminários em Medicina de Animais de Estimação Aviários e Exóticos* (Vol. 11, No. 1, pp. 2-14). WB Saunders.
- Tozzetti, D. S., Bataier, M. B. N., Almeida, L. D., & Piccinin, A. (2008). Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas–revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, 6(10), 1-7.

Zigo František, Vasil' Milan, Ondrašovičová Silvia, Výrostková Jana, Bujok Jolanta, Pecka-Kielb Ewa. Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*. v. 8. (2021).

II. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o uso de terapia fotodinâmica antimicrobiana associado a emulgeis contendo extratos naturais *Mimosa tenuiflora*, *Chlorella vulgaris* e óleo de copaíba na prevenção da mastite.

Avaliar o potencial de minerais quelatados, como zinco, cobre e selênio, na ativação do sistema imune e na redução da contagem de células somáticas no leite.

Objetivos específicos

Experimento I: Desenvolvimento e avaliação do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana e emulgeis com extratos naturais no pós-*dipping*

- Desenvolver e caracterizar emulgeis contendo extratos naturais de *Mimosa tenuiflora*, *Chlorella vulgaris* e óleo de copaíba;

- Testar a eficácia antimicrobiana *in vitro* destes emulgéis contra patógeno causador de mastite (*Staphylococcus aureus*);
- Avaliar a aplicação prática *in vivo* terapia fotodinâmica antimicrobiana associada aos emulgéis no manejo pós-*dipping*, analisando a capacidade de reduzir a carga microbiana nos tetos e no leite;

Experimento II: Avaliação do potencial de minerais quelatados na imunidade e saúde do úbere

- Investigar o efeito de minerais quelatados (zinco, cobre e selênio) na dieta de vacas leiteiras sobre o sistema imunológico;
- Quantificar contagem de células somáticas no leite.

III - Emulgel desinfetante natural associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana para prevenção da mastite bovina

Natural disinfectant emulgel associated with antimicrobial photodynamic therapy for prevention bovine mastitis

Artigo redigido conforme as normas da revista Ciência e Agrotecnologia

RESUMO

Convencionalmente, desinfetantes à base de iodo, hipoclorito ou ácido láctico são usados no pós-dipping para a higiene dos tetos em fazendas leiteiras. Como alternativa natural para a prevenção da mastite bovina, *Mimosa tenuiflora*, óleo de copaíba (*Copaifera martii*) e *Chlorella vulgaris* apresentam propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Associadas à terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), essas substâncias inibem *Staphylococcus aureus*. Este estudo desenvolveu dois emulgeis naturais contendo esses extratos e avaliou sua estabilidade, bioadesividade, textura e citotoxicidade. O estudo também avaliou a eficácia desses emulgeis naturais combinados à terapia fotodinâmica, para uso como pós-dipping para prevenção de mastite. Doze vacas das raças Holandesa e Jersey foram tratadas com: T1 - controle com uso de iodo, T2 - aplicação de emulgel EJO sem iluminação e T3 - aplicação de emulgel EJOC com iluminação. Os tetos de todas as vacas foram irradiados com luz LED vermelha. As formulações apresentaram estabilidade, comportamento pseudoplástico e natureza elástica, sem efeito citotóxico. O estudo *in vitro* evidenciou que os tratamentos com utilização de luz apresentaram eficácia na redução de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) para todas as concentrações de extratos testadas e os extratos também foram eficientes em romper biofilme pré-formado. No ensaio *in vivo*, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos para as contagens de células somáticas no leite, de estafilococos no leite e swabs dos tetos entre os tratamentos, indicando que os emulgeis têm potencial semelhante ao iodo como desinfetantes pós-imersão.

Termos de indexação: vacas leiteiras; extratos naturais; fotoinativação; qualidade do leite.

ABSTRACT

Conventionally, disinfectants based on iodine, hypochlorite or lactic acid are used in post-dipping for teat hygiene on dairy farms. As a natural alternative for the prevention of bovine mastitis, jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*), copaiba oil (*Copaifera martii*) and *Chlorella vulgaris* have antimicrobial and anti-inflammatory properties. Associated with antimicrobial photodynamic therapy (PDT), these substances inhibit *Staphylococcus aureus*. This study developed two natural emulgels containing these extracts and evaluated their stability, bioadhesiveness, texture and cytotoxicity. The study also evaluated the efficacy of these natural emulgels combined with photodynamic therapy, for use as post-dipping to prevent mastitis. Twelve Holstein and Jersey cows were treated with: T1 - control with the use of iodine, T2 - application of EJO emulgel without lighting and T3 - application of EJOC emulgel with lighting. The teats of all the cows were irradiated with red LED light. The formulations showed stability, pseudoplastic behavior and elastic nature, with no cytotoxic effect. The *in vitro* study showed that the treatments using light were effective in reducing *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) for all the concentrations of extracts tested and the extracts were also effective in breaking up pre-formed biofilm. In the *in vivo* test, there was no significant difference ($p > 0.05$) between treatments for somatic cell counts in milk, staphylococci in milk and teat swabs between treatments, indicating that emulgels have similar potential to iodine a post-immersion disinfectant.

Index terms: dairy cows; natural extracts; photoinactivation; milk quality.

INTRODUÇÃO

Alternativas terapêuticas para prevenção da mastite vêm ganhando destaque para reduzir a dependência de antibióticos e a resistência bacteriana, tornando a produção de leite mais sustentável. A *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) possui propriedades antimicrobianas (Santos et al., 2022). O óleo de copaíba (*Copaifera martii*), extraído de árvores do gênero *Copaifera*, é conhecido por suas atividades anti-inflamatórias no tratamento de doenças de pele (Seumaro et al., 2020). O óleo de copaíba é eficaz no tratamento de mastite, com efeito antibiótico e reparação tecidual (Estevão et al., 2013; Oliveira et al., 2020; Silva et al., 2022). A microalga *Chlorella vulgaris* possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, inibindo bactérias causadoras de mastite (Silva Junior et al., 2020). Alguns pigmentos de microalgas, como a clorofila, podem ter propriedades fotossensibilizadoras, gerando

espécies reativas ou oxigênio singlete, que causam danos celulares, em um tratamento conhecido como terapia fotodinâmica (Campanholi et al., 2022).

Considerando os problemas causados pela mastite bovina, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) utiliza compostos fotossensibilizadores ativados pela luz para gerar espécies reativas de oxigênio, inibindo microrganismos e biofilmes, contribuindo para a qualidade do leite (Broekgaarden et al., 2015; Teichert et al., 2022). Estudos *in situ* confirmam a eficácia do TFDa no pós-*dipping* (Silva Junior et al. 2019). Este estudo avaliou a inativação fotodinâmica de microrganismos, propondo um desinfetante fotossensível pós-*dipping*, com extratos naturais incorporados em uma matriz polimérica, para reduzir a contaminação por *Staphylococcus aureus* no leite e nos tetos de animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima para o preparo de emulgeis

O óleo-resina de copaíba foi coletado no município brasileiro de Baião-PA. O método de coleta do óleo-resina de copaíba empregou uma broca manual tradicional de 1 polegada para a perfuração mecânica no meio do tronco. O perímetro da árvore foi superior a 1,20 m (cerca de 40 cm de diâmetro). Os rolos foram perfurados na altura de cerca de 1– 1,5 m do solo. Após a perfuração, os furos foram mantidos fechados. O produto foi registrado no Sistema Nacional de Autorização e Informação sobre a Biodiversidade (SISBIO n.º 72922-1) e no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN n.º A0F0D20). A casca moída de preta-preta (*Mimosa tenuiflora*) foi adquirida em comércio local. Na cidade de Maringá- PR. A *C. vulgaris* foi adquirida em comércio local em Vila Nova, Jundiainópolis Jundia-SPE.

Formulação e Análises de Emulgeis

O extrato de jurema-preta foi preparado pela infusão de 200 g de casca moída em 1000 mL de água a 60 °C, sob agitação por 2 horas, seguida de filtração. Para quantificação, 10 g de jurema-preta foram infundidos em 50 mL de água e secos até massa constante. O emulgel foi desenvolvido utilizando Carbopol 934 P (0,25 % p/p) dissolvido em 100 g de extrato de jurema-preta (12,5 % p/p), agitado por 5 horas e ajustado para pH 7,0 com trietanolamina. O extrato de *Chlorella* (0,2 % p/p), rico em clorofila e sensível à luz, foi dissolvido em óleo de copaíba (4 % p/p) e adicionado ao

polímero sob agitação por 10 minutos. A formulação foi armazenada a 4 °C. O emulgel submetido à iluminação foi denominado EJOC, enquanto o emulgel sem iluminação foi denominado EJO.

As formulações foram submetidas a testes prévios de estabilidade, utilizando centrifugação (BioTek/Elx808, Synergy), teste de estabilidade acelerada e de vida útil (ANVISA, 2008). A análise do perfil de textura (TPA) foi realizada no módulo TAXTplus (Stable Micro Systems, Reino Unido), utilizando uma sonda de policarbonato de 10 mm de diâmetro. A sonda foi inserida duas vezes na amostra, a uma profundidade de 15 mm e a uma taxa de 2 mm/s⁻¹, com 15 s de descanso entre as compressões (Borghi-Pangoni et al., 2016).

A força bioadesiva do emulgel foi comprovada por um aplicador de textura, utilizando pele de orelha suína a 38°C. A pele foi introduzida em uma sonda, que foi pressionada contra o emulgel com uma força de 0,1 N por 30 s. Em seguida, a sonda foi elevada a 1,0 mm/s, medindo-se a força necessária para derrubar a pele. Os testes foram realizados em pelo menos seis repetições, utilizando o analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido); (Campanholi et al., 2018).

A determinação dos fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão. A dosagem dos flavonoides totais no extrato foi feita por espectrofotometria UV-Vis (Agilent Technologies/Cary 60); (Zhishen et al., 1999).

Para Análise Reológica de Cisalhamento Contínuo, as amostras foram analisadas em reômetro MARS II (Haake, Newington, Alemanha), utilizando uma geometria cone-placa paralela de 35 mm de diâmetro e ângulo de 2°, separadas por 0,105 mm, a 38 ± 1°C. Um gradiente de cisalhamento de 0 a 2000 s⁻¹ foi aplicado por 150 segundos. Foi realizada análise reológica de cisalhamento oscilatório usando o reômetro MARS II com geometria cone-placa. A região viscoelástica linear (LVR) foi determinada a 38 ± 1 °C, aplicando-se um gradiente de tensão de 0,01 a 20 Pa a 1 Hz. Em seguida, aplicou-se um gradiente de frequência de 0,1 a 10 Hz sob tensão constante, com análise dos parâmetros oscilatórios no programa RheoWin (Campanholi et al., 2018).

A citotoxicidade das formulações foi avaliada em fibroblastos murinos (células L-929) usando o ensaio de viabilidade celular baseado na redução de MTT MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Mossmann, 1983). As células L-929 foram cultivadas em meio DMEM com 10 % de soro fetal bovino, mantido a 37 °C e 5

% de CO₂ por 24 horas. Após a formação da monocamada, as fórmulas foram adicionadas em concentrações de 188 a 12.000 µg mL⁻¹ e incubadas por 48 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas e incubadas com MTT por 4 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados em Dimetilsulfóxido e a absorbância foi medida a 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle, e os valores de CC50 (concentração citotóxica a 50%) foram determinados por análise de regressão não linear, com os resultados expressos como média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Para a análise da concentração inibitória mínima (CIM), cada composto e o mix (jurema-preta + *Chlorella* + óleo de copaíba) foram testados contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL, sem iluminação e com iluminação, sendo utilizado fonte de luz LED vermelha 665 nm por 30 minutos a 15 cm de distância (Campanholi et al. 2022a).

Doze isolados estafilococos proveniente de amostras de leite cru foram avaliados para identificar os genes *nuc*, de produção de enterotoxina *sea* e de hemolisina *hly* e *hla*. Foram identificados por meio da análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Rall et al., 2014). Também foi avaliado o potencial fototóxico de *C. vulgaris* como fotossensibilizador (PS) em 10 % de leite desnatado reconstituído (LDR 10%). Após a inoculação, as amostras de leite foram refrigeradas (7 °C) no escuro por 10 min e foram iluminadas a uma distância de 15 cm por 5, 10 e 15 min (AOAC, 1992). Os controles foram realizados com leite inoculado sem e com PS sem iluminação para avaliar a atividade antimicrobiana no escuro. A capacidade de ruptura de biofilme dos extratos naturais foi determinada de acordo com Saini et al. (2023).

Ensaio *in vivo* em bovinos lactantes usando emulgéis como pós-dipping

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA/UEM), sob Protocolo nº 6646060323.

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental do Iguatemi (FEI/UEM), da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. Antes da ordenha os tetos dos animais eram lavados com água e secos com papel toalha descartável. Após a ordenha mecânica o procedimento pós-dipping era realizado. Para aplicação foram utilizados 12 animais das raças Holandesas e Jersey em diferentes estágios de lactação, com peso médio de 500 kg e produção média de 20 litros/dia, mantidas em pastagem e

suplementadas com silagem de milho e concentrado de grão de milho, por um período de 71 dias.

Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino quadruplo 3x3, com 7 dias de adaptação e 21 dias de coleta. Os tratamentos foram: T1 - controle, aplicação de iodo como pós-*dipping*; T2 - aplicação de emulgel EJO sem iluminação (jurema-preta e óleo de copaíba); T3 - aplicação de emulgel EJOC com iluminação (jurema-preta, *Chlorella vulgaris* e óleo de copaíba). Os tetos foram irradiados com luz LED vermelha de 665 nm, irradiância de $3,40 \times 10^3 \text{ W cm}^{-2}$, a uma distância de 3 cm por 1 min. Para garantir o alcance de todos os tetos dos animais do T3, um bastão de madeira foi acoplado ao Led. Avaliações microbiológicas e análises do leite foram realizadas nos dias 7, 14, 21 e 28. As contagens de *Staphylococcus* spp. foram realizadas por coleta de suabes e leite em sementeira em Ágar Baird Parker (BP). A contagem de células somáticas (CCS) foi usando Ekomilk Scan (CapLab). As amostras sanguíneas foram colhidas nos dias 0 e 28, após a primeira ordenha da manhã por meio de punção da jugular utilizando agulhas descartáveis e tubos Vacutainer® com adição de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Viana et al., 2002). As amostras de sangue foram mantidas em caixa térmica com gelo até a chegada ao laboratório particular, onde, num prazo de 24 horas, será realizado o hemograma que consistirá em contagem global do número de hemácias, determinação do volume globular, teor de hemoglobina, índices hematimétricos absolutos, contagem global do número de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos.

Análise Estatística

Os dados obtidos *in vitro* e *in vivo* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) foi determinada por meio do teste de Tukey utilizando o software SAS 9.3 (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo Preliminar de Estabilidade de Formulações

As formulações foram estáveis nos estudos de estabilidade preliminar e acelerada, sem separação de fases e incorporação adequada de óleo de copaíba. O emulgel EJO manteve estabilidade estrutural, coloração e ausência de separação de fases por até oito meses. As formulações demonstraram viscosidade desejável, aparência consistente, estabilidade física e adesão satisfatória. Para análise de textura, foi observada diferença significativa nas variáveis ($p < 0,05$), exceto para elasticidade ($p > 0,05$). A força necessária para dureza (N), compressibilidade (N.mm) e adesividade (N.mm) foi maior para o emulgel EJO.

Tabela 1. Caracterização mecânica de emulgéis de óleo de copaíba (*Copaifera martii*), jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) e *Chlorella* e bioadesividade em pele *ex vivo*

Propriedades	EJO	EJOC	IODO	p valor
Dureza (N)	0,155 ± 0,003a	0,067 ± 0,000b	0,034 ± 0,013c	<0,0001
Compressibilidade (N.mm)	1,305 ± 0,086a	0,363 ± 0,069b	0,079 ± 0,011c	<0,0001
Adesividade (N.mm)	0,736 ± 0,044a	0,232 ± 0,010b	0,000 ± 0,000c	<0,0001
Elasticidade (mm)	0,995 ± 0,001a	0,998 ± 0,000a	0,980 ± 0,06a	>0,9534
Coesão (Adimensional)	1,218 ± 0,072a	0,000 ± 0,000a	1,005 ± 0,133b	<0,0001
Bioadesividade				
Força máxima (N)	0,063 ± 0,009	0,069 ± 0,005		<0,0001
Trabalho de bioadesão (N.mm)	0,009 ± 0,000	0,011 ± 0,000		<0,0001

EJO = emulgel de jurema-preta e óleo de copaíba; EJOC = emulgel de jurema-preta, óleo de copaíba e *Chlorella vulgaris*; Iodo = controle; Bioadesividade em pele *ex vivo*; valores representam a média (± desvio padrão); $p < 0,05$. Médias seguidas pela mesma letra na linha são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A estabilidade do produto é influenciada pela interação entre o óleo e o Carbopol, o que pode causar separação de fases; no entanto, isso não ocorreu no presente estudo, onde o óleo interagiu adequadamente com demais componentes; falhas no teste de centrifugação exigem reformulação. No teste de estabilidade acelerada, o EJOC apresentou instabilidade, possivelmente devido à fotodegradação de *C. vulgaris*.

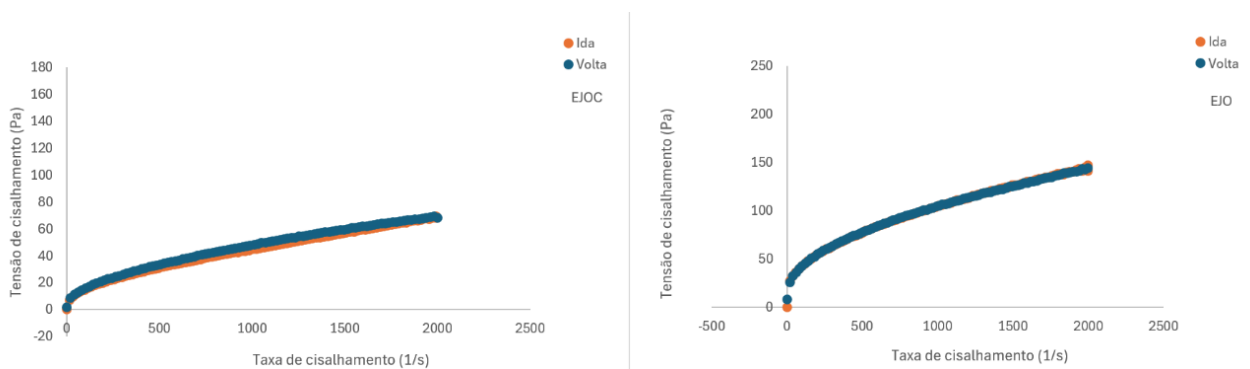
A radiação luminosa pode alterar a cor e o odor dos componentes, e a evaporação por aquecimento resultou em uma textura mais fluida, revertida com a refrigeração.

A adesividade favorece a permanência do emugel nos tetos. A coesividade do emugel afeta a capacidade de manter sua integridade; no entanto, a adesão à pele depende mais da adesividade do emugel do que de sua coesividade. Portanto, a falta de coesividade do EJO não impede necessariamente a adesão. A coesividade indica maior viscosidade e estrutura (Oliveira et al., 2021).

Houve diferença significativa para as variáveis analisadas quanto à bioadesão na pele *ex vivo* ($p < 0,05$). A bioadesividade do EJO foi maior, demonstrando maior compatibilidade na adesividade cutânea (Tabela 1). O EJO possui maiores propriedades bioadesivas em comparação ao EJO, relacionadas às suas características mecânicas e capacidade de interação com a superfície da pele. Isso garante que os princípios ativos sejam liberados no local da aplicação, aumentando o tempo de contato e, conseqüentemente, a eficácia. Estudos sobre géis bioadesivos com princípios fitoterápicos, utilizando polímeros como o Carbopol e substâncias bioativas naturais, como óleos e clorofila, mostram grande potencial terapêutico (Campanholi et al., 2022).

Os valores médios para polifenóis totais foram de 16,976 mg EAG/L para a jurema-preta e 16,1571 mg EAG/L para a *C. vulgaris*. Os valores de flavonoides foram de 983,941 mL/eq quercentina e 134,2084 mL/eq quercentina, respectivamente. A alta concentração de flavonoides e taninos na jurema-preta confere propriedades antimicrobianas, inibindo o crescimento de diversas bactérias, destacando seu potencial como agente natural (Santos et al. 2022). Os valores relatados na literatura foram: extrato de jurema-preta 5,4989 µg/ml de flavonoides, fenólicos totais de 50,584 µg/ml (Silva et al., 2021) e para *C. vulgaris* de 24,95 mg/100 g para fenólicos totais (Miranda et al. 2001).

Os emulgéis apresentaram comportamento pseudoplástico e viscosidade não linear (não newtoniana, $n < 1$) do tipo tixotrópico, apresentando pequena área de histerese 714,60 Pa/s (EJO) e 4414,33 Pa/s (EJO), caracterizada pela capacidade de aumentar a viscosidade do material após aplicação de tensão. EJO apresentou tensão de escoamento.



Houve diferença significativa para as variáveis K e N ($p < 0,05$) (Figura 1).

Figura 1. Reologia de cisalhamento contínuo das formulações a 38 °C; curvas de fluxo de sistemas emulgel; EJO = jurema-preta, óleo de copaíba, *Chlorella vulgaris*; EJO = jurema-preta, óleo de copaíba.

Os emulgéis apresentaram comportamento $G' > G''$, apresentando natureza elástica, conferindo propriedades viscoelásticas, apresentando-se como um sistema estruturado, com interações entre seus constituintes (Figura 2).

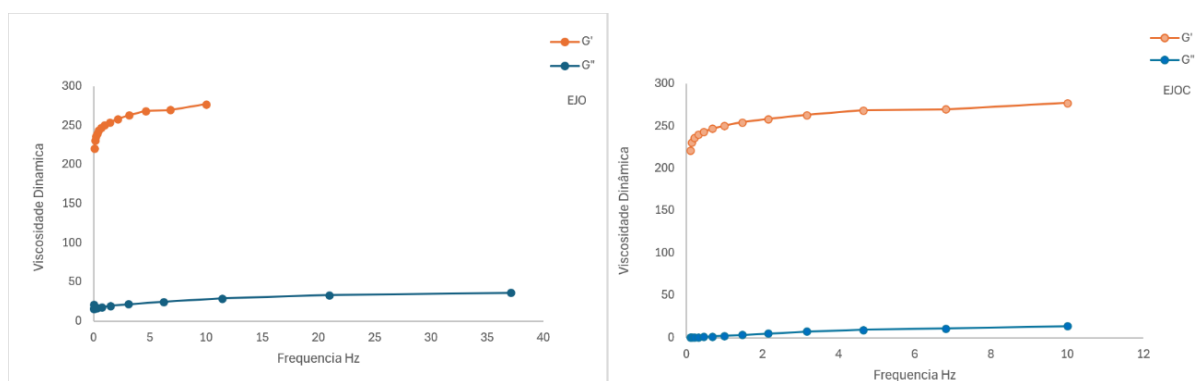


Figura 2. Reograma de cisalhamento oscilatório a 38 °C; EJO = jurema-preta, óleo de copaíba; EJOc = jurema-preta, óleo de copaíba e *Chlorella vulgaris*.

Os materiais analisados apresentaram comportamento pseudoplástico, com viscosidade adequada para aplicação tópica, o que facilita a espalhabilidade e a adesão à pele. Também apresentaram comportamento tixotrópico. Na reologia oscilatória, os emulgéis apresentaram predominância elástica sobre viscosa ($G' > G''$) em baixas frequências, indicando boa estabilidade mecânica. A transição do comportamento elástico para viscoso foi observada na frequência crítica. Esses resultados sugerem que a formulação possui estrutura coesa e estável, reforçada pela presença de compostos bioativos, como polissacarídeos e compostos fenólicos, que contribuem para sua eficácia e estabilidade (Narvaes et al., 2023).

Em relação à toxicidade foi observado um efeito dose-dependente, ou seja, com o aumento da concentração dos extratos houve diminuição da viabilidade celular. Entretanto, essa diminuição só ocorreu de forma mais proeminente em concentrações maiores que 1.500 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3).

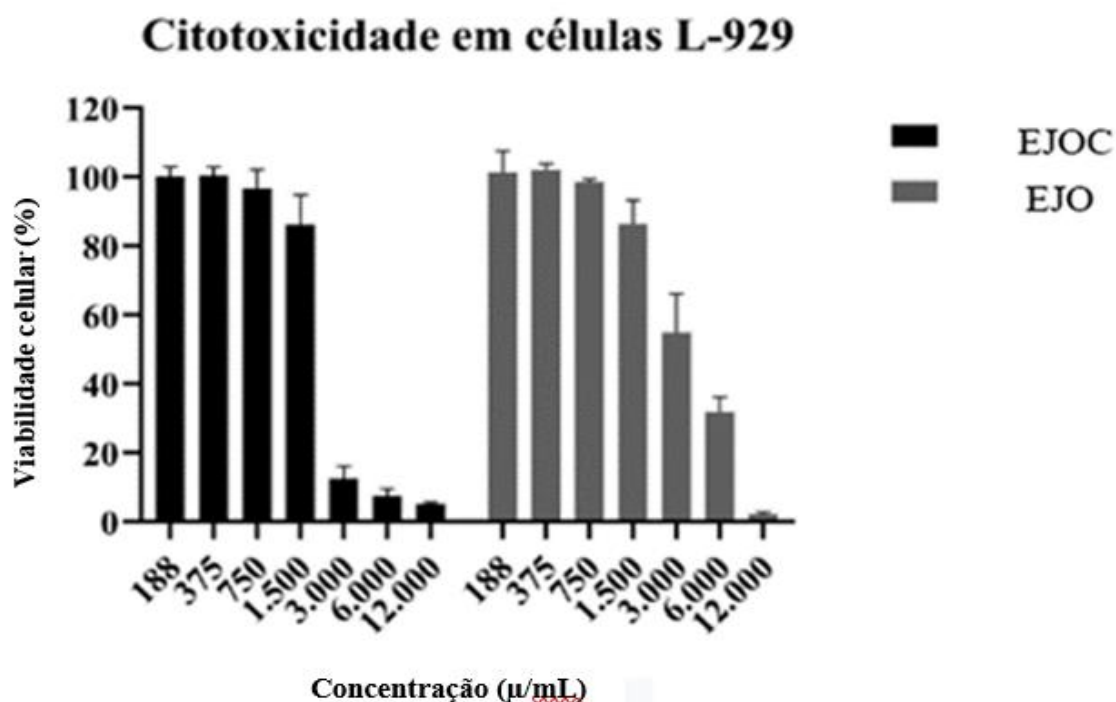


Figura 3. Avaliação da citotoxicidade das fórmulas contra fibroblastos; EJOE = emulgel de jurema-preta, óleo de copaíba e *Chlorella vulgaris*; EJO = emulgel de jurema-preta e óleo de copaíba.

O óleo de copaíba é reconhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes, e é geralmente seguro em concentrações moderadas, mas altas doses podem causar citotoxicidade em algumas células. A adição de *C. vulgaris* ao emulgel EJOE parece ter reduzido os efeitos tóxicos, aumentando a viabilidade celular em concentrações intermediárias, tal fato está de acordo com as evidências de que a *C. vulgaris* pode aumentar a estabilidade das formulações e oferecer proteção celular devido à presença de clorofila e polissacarídeos, que promovem o reparo tecidual e reduzem o estresse oxidativo (Latif et al., 2021). O emulgel EJOE mostra vantagens na viabilidade celular em concentrações mais altas, tornando-o benéfico para aplicações tópicas com baixa toxicidade. Esses resultados destacam a importância de combinar extratos vegetais com atividades sinérgicas, como óleo de copaíba e *C. vulgaris*, para otimizar a eficácia e a segurança das formulações.

Para a avaliação *in vitro* contra *S. aureus*, o mix dos extratos reduziu 100% contagem microbiana na concentração de 25 mg com o uso de luz. A cepa padrão (*S. aureus* ATCC 25923) submetido e não submetido à iluminação apresentou valor de 7,90 e 8,00 log UFC/mL, respectivamente. Ao testar-se diferentes concentrações de extrato

de *C. vulgaris* e jurema-preta, a concentração que mais inibiu o crescimento foi de 12,5 mg com luz, sendo o valor de redução decimal da cepa controle de 5,33 log UFC/mL e 5,34 log UFC/mL, respectivamente. Para o óleo de copaíba, a concentração de 100 mg com luz obteve maior redução com 4,92 Log UFC/mL.

C. vulgaris possui grande potencial antimicrobiano, variando com o tipo de solvente e as espécies bacterianas testadas. Bezerro et al. (2009) relataram eficácia no tratamento de mastite bovina com concentrações de 107,5 mg/mL de extrato de jurema-preta devido aos compostos bioativos como alcaloides, flavonoides e taninos presentes na planta. Almeida et al. (2020) relataram um MIC de óleo-resina de copaíba de 1,63 mg/mL para *S. aureus*.

Todos os 12 isolados amplificaram o gene *nuc* e apenas duas bactérias para o gene *hla* e *hnb* e três bactérias amplificaram o gene *sea*. A presença do gene *nuc* é usada para caracterizar a espécie *S. aureus* (Figura 4).

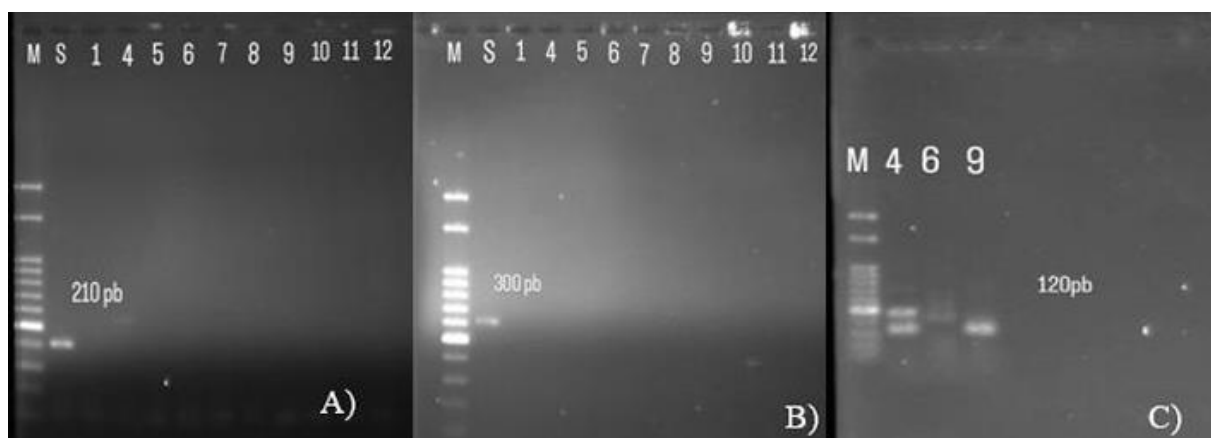


Figura 4. Genes para produção de enterotoxina e alfa hemolisina; A) imagem de eletroforese em gel de agarose do gene *hla* (210 pb); B) gene *hnb* (300 pb); C) gene *sea* (120 pb) de diferentes isolados de *Staphylococcus aureus. aureus* provenientes de leite de vaca; S = cepa padrão; M = marcador.

A presença do gene *sea* é essencial para a produção de toxinas e contribui para sua virulência. Os genes, *hla* e *hnb* codificam hemolisinas que aumentam a capacidade do *S. aureus* no hospedeiro em agravar infecções como a mastite.

Em relação à fotoinativação destes isolados no leite, os resultados evidenciaram diferenças significativas entre as cepas ($p < 0,0001$) e os tempos de exposição ($p < 0,0001$) (Figura 5), sendo o tempo de exposição a luz de 10 minutos mais eficiente para

os isolados 1, 4, 9 e 10. Estudos utilizando a fotoinativação *in vitro* mostram sua eficácia em bactérias Gram positivas, embora tais bactérias tenham estrutura de parede celular mais complexas, tornando-as mais espessas, dificultando a penetração de fotossensibilizadores e, portanto, essas bactérias teoricamente, seriam mais resistentes à inativação fotodinâmica (Melo et al., 2013). Dos Anjos et al. (2020) avaliando o efeito da luz azul sobre *S. aureus*, evidenciaram uma redução de mais de 5,0 log₁₀ por 2 horas.

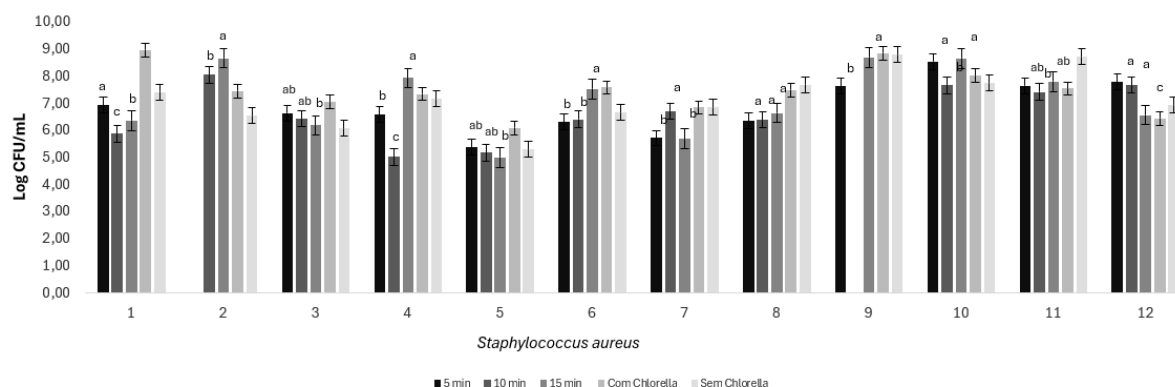


Figura 5. Inativação fotodinâmica de 12 cepas de *Staphylococcus aureus* em leite LDR 10%; LDR + *Chlorella vulgaris* com e sem fotoinativação; Com *C. vulgaris* = cepas com extrato de *Chlorella* após 10 min no escuro a 5 °C; sem luz *Chlorella* = cepas sem extrato *C. vulgaris* após 10 min no escuro a 5 °C; 5 min, 10 min e 15 min = tempos de exposição à fotoinativação das 12 cepas isoladas.

O extrato de jurema-preta e *C. vulgaris* promoveram atividade bactericida contra os isolados em biofilme pré-formado (Tabela 2). Estes compostos inibem a síntese de polissacarídeos, alterando a integridade da membrana bacteriana proporcionando a ruptura dos biofilmes pré-formados. Essa estratégia pode ser promissora para o desenvolvimento de tratamentos naturais contra infecções bacterianas em biofilmes, principalmente em contextos veterinários. Destaque para as menores concentrações de extratos testados (0,78125 µg) as quais foram eficientes em romper 70,36% e 66,62% de biofilme pré-formado.

Formação de biofilmes por *S. aureus* é um desafio no tratamento de infecções, devido a resistência que as bactérias Gram-positivas. Com isso, estudos visando a atividade bactericida de diferentes compostos contra biofilmes pré-formados tornam-se necessário. As frações do extrato de *C. urucarana* erradicaram *S. aureus* em biofilmes de

forma equivalente ao antibiótico vancomicina, onde o extrato (5 mg/mL⁻¹) foi capaz de inibir 88,94% da formação da matriz bacteriana de *S. aureus*. Ainda, Reiter et al. (2012) avaliaram a eficiência da rifampicina, isoladamente e em combinação com vancomicina, contra biofilmes maduros de *S. aureus*. Os autores indicaram que a rifampicina sozinha não foi eficaz na erradicação dos biofilmes, porém a combinação apresentou capacidade inibitória, mas não conseguiu eliminar completamente o biofilme *in vitro*. Esses estudos demonstram a importância de diversos extratos naturais na inibição e erradicação de biofilmes de *S. aureus*, indicando o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos.

Tabela 2. Atividade bactericida do extrato de jurema-preta e *Chlorella vulgaris* sobre isolados de *Staphylococcus aureus* presentes em biofilme

Extratos	Jurema-preta		Chlorella vulgaris	
	Concentração (células/mL)			
Bactérias/concentração	100	0,78125	100	0,78125
	Inibição de biofilme (%)			
CP	73,24% ± 0,018	61,60% ± 0,313	73,14% ± 0,082	61,19% ± 0,356
	76,78% ± 0,026	64,88% ± 0,331	78,36% ± 0,061	65,36% ± 0,369
Sv1	74,96% ± 0,004	68,94% ± 0,016	75,40% ± 0,009	66,62% ± 0,042
Sv3				
Sv5	72,78% ± 0,061	70,36% ± 0,161	71,04% ± 0,042	52,97% ± 0,042

CP = cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); Sv1, Sv3 e Sv5 = cepas de *S. aureus*; 100 = maior concentração testada; 0,78125 = menor concentração testada; valores representam a média (± desvio padrão).

Ensaio *in vivo* em bovinos lactantes usando emulgéis como pós-dipping

Com base na análise estatística dos dados físico-químicos e microbiológicos do leite e tetos, observou-se que a maioria dos parâmetros avaliados não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os três tratamentos testados ($p > 0,05$). A exceção foi a variável SWAB_Log10, que apresentou diferenças significativas nas comparações entre os tratamentos 1x2 ($p = 0.001$) e 2x3 ($p = 0.025$). Esses resultados

indicam que o tratamento 2 teve maior contaminação microbiológica em superfícies, sugerindo possível falha na sanitização ou menor eficiência do protocolo aplicado nesse grupo (Tabela 3).

Os parâmetros CCS_log10 (contagem de células somáticas), gordura (G), sólidos totais (ST), densidade (D), proteína (P), lactose (L), SL (sólidos), contagem bacteriana do leite (LEITE_Log10) e produção de leite (PROD_LEITE) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Isso sugere que os diferentes tratamentos aplicados não influenciaram de forma relevante a composição ou qualidade físico-química do leite (Tabela 3).

Apesar de alguns parâmetros como SL apresentar erros padrão médios (EPM) baixos, indicando certa variação entre os tratamentos, os testes estatísticos não confirmaram essas diferenças como significativas. Esses achados indicam uma relativa estabilidade nas características do leite, independentemente do tratamento aplicado, com exceção da contaminação microbiológica de superfícies (Tabela 3).

A presença de diferença significativa apenas na variável SWAB_Log10 reforça a importância da eficácia do protocolo de higiene na ordenha, sugerindo que o tratamento 2 pode demandar revisão quanto à sua eficiência sanitária.

Os valores de CCS obtidos foram inferiores aos limites estabelecidos pela IN 76, que estabelecem uma contagem máxima de 5,70 log10 (500.000 células/ml). Assim como no presente estudo, Silva Júnior et al. (2019) demonstraram que o uso de um hidrogel de SF (fotossensibilizador) foi equivalente ao iodo, garantindo qualidade microbiológica e baixa CCS. Os emulgeis atuaram como um produto antisséptico, proporcionando adequada cobertura dos tetos, atuando como uma barreira física. A adição de carbopol C934P proporcionou melhor adesividade, estabilidade e consistência, por ser um polímero sintético hidrofílico derivado do ácido poliacrílico (Campanholi et al., 2022).

Tabela 3. Contagem de células somáticas no leite, composição físico-química do leite, contagem de estafilococos nos tetos e leite de vacas submetidas à aplicação de emulgéis

Variável	Trat 1 (Iodo)	Trat 2 (Emulgel)	Trat 3 (Emulgel + Luz)	EPM	p - valor		
					1 x 2	1 x 3	2 x 3
CCS_log10	5.27	5.28	5.16	0.1331	0.979	0.554	0.536
G	4.84	4.44	4.61	0.1902	0.158	0.413	0.537
ST	9.69	9.64	9.82	0.2105	0.874	0.672	0.553
D	33.42	33.56	34.24	0.6949	0.884	0.417	0.503
P	3.55	3.52	3.62	0.0798	0.777	0.519	0.357
L	5.22	5.18	5.30	0.0961	0.798	0.588	0.427
SL	0.80	0.79	0.82	0.0163	0.701	0.490	0.287
SWAB_Log10	2.02	2.46	2.18	0.0822	0.001*	0.212	0.025*
LEITE_Log10	2.28	2.78	2.66	0.2272	0.137	0.254	0.713
PROD_LEITE	15.16	16.54	15.73	2.0093	0.636	0.846	0.779

CCS = Contagem de células somáticas; Tratamento 1 = Iodo; Tratamento 2 = Emulgel; Tratamento 3 = Emulgel + Luz; G = gordura (%); ST = sólidos desengordurados; D = densidade (kg/L); L = lactose; SL = sólidos; P = proteína (%); SWAB_Log10 = contagem de estafilococos no teto; LEITE_Log10 = contagem de estafilococos no leite; Prod leite = produção de leite/L; EPM = erro padrão médio. Valor de p. Valores com *asterisco* indicam significância ($p < 0,05$).

Tabela 4. Análise de parâmetros hematológicos de vacas utilizando pós-*dipping* com extratos de jurema-preta, óleo de copaíba e *Chlorella vulgaris*

Tratamento	HE	Hemograma											
		HEMO	HEMA	V.C.M	CHC	RDW	PLAQ	LEU	SEG	LIN	MON	EOS	BAS
Emulgel	5,693a	8,45a	27,666a	48,400a	30,466a	14,333a	244,00a	12,350a	24,166a	58,000a	2,166a	15,500a	0,166a
Emulgel+Luz	5,440a	7,516a	24,783a	45,383a	30,183a	14,166a	14,633a	29,500a	49,333a	2,000a	19,000a	0,166a	0,166a
Iodo	4,583a	6,700a	21,933a										
				39,833a	25,433a	11,833a	227,50a						
Dias													
1	4,681a	6,555a	22,000a	41,677a	26,444a	12,555a	260,00a	11,922a	22,222a	43,444a	1,444a	21,555a	0,222a
28	5,796a	8,555a	27,588a	47,400a	30,944a	14,333a	258,44a	15,811a	30,666a	57,777a	2,000a	9,444b	0,111a
SD	1,416	2,319	7,468	12,186	7,123	3,349	101,299	5,775	17,641	21,721	2,309	11,785	0,408
<i>p-valor</i>													
Tratamento (A)	0,3927	0,4495	0,4384	0,4877	0,4877	0,3818	0,3945	0,7389	0,8658	0,5671	0,6492	0,6022	
Dia (C)	0,1207	0,0923	0,1384	0,3389	0,3389	0,2823	0,9745	0,1787	0,3299	0,1869	0,6191	0,0499	0,5744
Int. AxC	0,6787	0,8657	0,830	0,6646	0,6646	0,3722	0,1036	0,2603	0,4158	0,8616	0,6127	0,3141	0,3000

HE = eritrócitos; HEMO = hemoglobina; HEMA = hematócitos; VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média); RDW = largura de distribuição de hemácias; PLAQ = plaquetas; LEU = leucócitos; SEG = segmentado; LIN = linfócitos; MON = monófilos; EOS = eosinófilos; BAS = basófilos.

Os valores de referência são: eritrócitos (5,00 a 10,00 milhões/ μ l); hemoglobina (8,0 a 15,0 g/dL); hematócitos (24 a 46%); VCM (40,0 a 60,0 pg); CHCM (30 a 36%); plaquetas (100.000 a 800.000/ μ l); leucócitos (4.000 a 12.000/ μ l); segmentados (15 a 45%); linfócitos (45 a 75%); monócitos (2 a 7%); eosinófilos (2 a 20%); basófilos (0 a 2%).

Fonte: Schalm's Veterinary Hematology (2010).

Para o hemograma, não houve diferenças significativas para os parâmetros avaliados ($p > 0,05$) (Tabela 4). Entretanto, no dia 28, os animais apresentaram redução significativa nos valores de eosinófilos ($p < 0,024$) e para a interação dias x tratamento para eosinófilos, a menor contagem foi para o grupo emugel contendo jurema, *C. vulgaris* e óleo de copaíba (EJOC) (Material suplementar, Tabela S4).

No presente estudo, os valores obtidos estavam de acordo com os limites de referência para eosinófilos, valores menores podem indicar estresse, infecções agudas, uso de corticoides, prenhes, lactação ou reações alérgicas graves. Em casos de mastite, a resposta imune tende a priorizar a ativação de neutrófilos, resultando em diminuição da contagem de eosinófilos (Braun et al. 2021).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que os emulgéis apresentaram características físico-químicas projetadas, como estabilidade, bioadesividade e comportamento pseudoplástico, tornando-as uma opção promissora para aplicações terapêuticas. Além disso, a associação de extratos naturais à terapia fotodinâmica mostrou-se eficaz na redução de *Staphylococcus aureus*, sem efeitos citotóxicos e com capacidade de rompimento de biofilmes, reforçando seu potencial no combate a infecções bacterianas. No contexto da aplicação pós-dipping, os achados indicam que as formulações testadas possuem desempenho semelhante ao iodo na manutenção da CCS e no controle de estafilococos, evidenciando seu potencial como alternativa antisséptica para a prevenção da mastite bovina. Assim, os resultados ressaltam as opções do uso de estratégias naturais e inovadoras para o controle microbiano.

CONTRIBUIÇÃO DO AUTOR

Ideia Conceitual: Pozza, MSS; Caetano, W.; Desenho metodológico: Junior, RCS e Pozza, MSS; Coleta de dados: Bispo, AS; de Paula, G., Balbinot, RB; Oliveira, MAS; Martins, G.L.; Análise e interpretação dos dados: Nakamura, NV; Silva, JB; Redação e edição: Bispo, AS; Pozza, MSS.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Universidade Estadual de Maringá pelo apoio, ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro por meio da

bolsa e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Cadeia Produtiva do Leite (INCT Leite).

REFERÊNCIAS

- Almeida, J. E et al. (2020). Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da oleo-resina de copaíba. Revista Uningá, v. 57, n. 2, p. 12-22. <https://doi.org/10.46311/2318-0579.57.eUJ3281>.
- ANVISA, (2004). Política Atual de Regulação de Medicamentos no Brasil. Recuperado em 4 de julho de 2023, disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/manual_politica_medicamentos.pdf.
- Araújo, M. T. M et al. (2022). As propriedades do óleo de *Copaifera ssp.* em estudos laboratoriais e clínicos: uma revisão de literatura. Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento. 11. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.27994>.
- Bezerra, D. A et al. (2009). Atividade biológica da jurema-negra (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. Revista Brasileira de Farmacognosia. 19: 814-817. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600002>.
- Borghi-Pangoni, F. B et al. (2016). Triagem e avaliação de sistema termorresponsivo mucoadesivo contendo azul de metileno para terapia fotodinâmica local de câncer colorretal. Pharmaceutical Research, vol. 33, no. 3, p. 776–791, 9 de março.
- Brasil. (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução normativa n.º 76 de 26 de novembro de 2018. Regulamento técnico que estabelece as características de identidade e qualidade que o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A devem apresentar. Recuperado em 27 de fevereiro de 2024. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-201852749894IN%2076.
- Braun, U. et al. (2021). Achados hematológicos em 158 vacas com mastite tóxica aguda com foco no leucograma. Acta Vet Scand 63, 11 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13028-021-00576-0>.

- Broekgaarden, M et al. (2015). Vias de sobrevivência de células tumorais ativadas por terapia fotodinâmica: uma base molecular para estratégias de inibição farmacológica. *Cancer and Metastasis Reviews*. 34: 643-690. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9588-7>.
- Campanholi, K. D. S et al. (2018). Desenvolvimento de plataforma biomédica de um extrato à base de clorofila para terapia fotodinâmica tópica: propriedades mecânicas e espectroscópicas. *Langmuir*. 34: 8230-8244. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00658>.
- Campanholi, K. D. S. S et al. (2022). Plataforma tópica responsiva a estímulos térmicos baseados em óleo-resina de copaíba: Design e desempenho na pele humana *ex-vivo*. *Jornal de Líquidos Moleculares*, 361, 119625.
- Campanholi, K. D. S. S et al. (2022a). Design e otimização de gel preenchido com emulsão responsiva a estímulos para administração tópica de óleo de copaíba-resina. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111: 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.10.003>.
- Campanholi, K. D. S. S et al. (2022b). Design e otimização de um medicamento natural de *Copaifera reticulata* Ducke para tratamento de feridas cutâneas. *Polímeros*. 14: 4483. <https://doi.org/10.3390/polym14214483>.
- Campanholi, K. D. S. S et al. (2022c). Plataforma tópica responsiva a estímulos térmicos baseada em óleo-resina de copaíba: Design e desempenho sobre pele humana *ex-vivo*. *Journal of Molecular Liquids*. 361: 119625. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119625>.
- Campanholi, K. D. S. S et al. (2022d). Emulgel termo e fotorresponsivo carregado com *Copaifera reticulata* Ducke e clorofilas: propriedades reológicas, mecânicas, fotodinâmicas e de administração de fármacos na pele humana. *Farmacêutica*. 14:2798. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122798>.
- Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico. (2000). Métodos para testes de suscetibilidade antimicrobiana de diluição para bactérias que crescem aerobicamente. Padrão aprovado M7-A5. NCCLS.
- Dos Anjos, C et al. (2020). Inativação de patógenos transmitidos pelo leite pela exposição à luz azul *Journal of Dairy Science* 103, 1261– 1268. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16758>.
- Estevão, L. R. M et al. (2003). Efeitos da administração tópica de pomada de óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) na viabilidade de retalhos de pele de ratos. *Acta Cir.* 2013,28, 863-869. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013001200009>.

- Faria, M. J. M. D et al. (2017). Atividade antimicrobiana de *copaifera spp.* Frente às bactérias isoladas do leite de vaca com mastite. *Ciência Animal Brasileira*, 18, e39068. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-39068>.
- Latif, A. A. E et al. (2021). Papel protetor de *Chlorella vulgaris* com Tiamina contra efeitos tóxicos induzidos por Paracetamol em parâmetros hematológicos, bioquímicos, de estresse oxidativo e alterações histopatológicas em ratos Wistar. *Relatórios Científicos*. 11:3911. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83316-8>.
- Lopes, T. S et al. (2020). Uso de extratos vegetais e óleos essenciais no controle da mastite bovina. *Pesquisa em Ciência Veterinária*. 131: 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>.
- Melo, W. C. M. A et al. (2013). Inativação fotodinâmica de biofilme: falando de uma abordagem levemente colorida para infecção persistente. *Expert Review of Anti Infective Therapy* 11 (7), 669-693. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.811861>.
- Miranda, M. S, Sato, S, & Mancini-Filho, J. (2001). Atividade antioxidante da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em condições especiais. *Bollett Chimi Farm*, 140, 165-168. <https://doi.org/10.14719/pst.1560>.
- Mossmann, T (1983). Ensaio colorimétrico rápido para crescimento e sobrevivência celular: aplicação em ensaios de proliferação e citotoxicidade. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Narvaes, J. V. R et al. (2023). Avaliação da eficácia de *Chamomilla recutita L.* no tratamento de lesões de pele. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*. 12. <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i4.41300>.
- Oliveira, D. F. D, Nascimento, T. P, Rodrigues, C. H, Batista, J. M, Liu, T. P, Medeiros, E. S. D, & Porto, A. L. F (2020). Potencial antimicrobiano do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga Hayne-Leguminosae*) contra isolados multirresistentes de mastite bubalina. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(4), e20200521. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020200521>.
- Oliveira, É.L et al. (2021). Cloreto de alumínio ftalocianina com carga de hidrogel termorresponsivo como plataforma de liberação de fármacos para administração tópica em terapia fotodinâmica. *Langmuir*. 37: 320-3213. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00148?ref=pdf>.
- Reiter, KC, Sambrano, GE, Villa, B., Paim, TGDS, Oliveira, CFD, & d'Azevedo, PA (2012). A rifampicina não consegue erradicar o biofilme maduro formado por *Staphylococcus*

- aureus resistente à metilicina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45, 471-474. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000400011>.
- Saini, S., Mishra, P., Balhara, M., Dutta, D., Ghosh, S., & Chaudhuri, S. (2023). Antimicrobial potency of Punica granatum peel extract: Against multidrug resistant clinical isolates. *Gene Reports*, 30, 101744.
- Santos, R. F et al. (2022). Propriedades antimicrobianas de extratos de pera de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (wild.) poir). *Revista Brasileira de Desenvolvimento*. 8: 16915-16930. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n3-094>.
- Schweizer, M et al. (2013). Eficácia de uma intervenção combinada de descolonização e profilaxia para diminuir infecções de sítio cirúrgico por Gram positivo após cirurgia cardíaca ou ortopédica: revisão sistemática e meta-análise. *Bmj*. 346. <https://doi.org/10.1136/bmj.f2743>.
- Sedighi, M et al. (2016). Efeitos potenciais na saúde de hidrolisados de proteína enzimática de *Chlorella vulgaris*. *Applied Food Biotechnology*. 3: 160-169. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i3.12789>.
- Seumaro, G. V et al. (2020). Estudo *in vivo* das atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas da oleo-resina Benth de *Copaifera Pubiflora*. *Nat. Prod. Res.*36, 1129–1133.
- Shendge, R. S & Dimote, R. K. (2024). Formulação e otimização de gel carregado com sílica mesoporosa contendo extrato de *Rosmarinus officinalis* para tratamento de cicatrização aguda de feridas. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 11, 100155. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2024.100155>.
- Silva Junior, R. C et al. (2019). Desenvolvimento e aplicações de nanocarreadores fotoativos Pluronic® F127 e P123 carregados com safranina para prevenção de mastite bovina: estudos *in vitro* e *in vivo*. *Corantes e Pigmentos*. 167: 204-215. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.04.037>.
- Silva Junior, R. C et al. (2020). Hidrogel responsivo a estímulos fototérmicos contendo safranina para tratamento de mastite em veterinária usando fototerapia. *ACS Applied BioMaterials*. 1:1-10. <https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c01143?ref=pdf>.
- Silva Junior, RC, Campanholi, KDSS, Maciel, BC, de Moraes Pinto, LA, de Moraes, FAP, dos Santos Rando, F., & Caetano, W. (2023). Fotossensibilizador natural carregado em copolímero micelar para prevenir mastite bovina: Um novo protocolo pós-dipping na ordenha. *Fotodiagnóstico e Terapia Fotodinâmica*, 42, 103337.

- Silva, I. D. D. L et al. (2021). Avaliação do potencial de extratos vegetais de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) para uso em embalagens com ativos antimicrobianos e antioxidantes. *Matéria* (Rio de Janeiro), v. 26, n. 01, p. e12924. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210001.1224>.
- Símaro, G. V et al. (2020). Estudo *in vivo* das atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas da oleo-resina *Benth de Copaifera Pubiflora*. *Nat. Prod. Res.* 36, 1129–1133. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1855639>.
- Teichert M. C et al. (2022). Tratamento de candidíase oral com terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno em um modelo murino imunodeficiente. *Cirurgia Oral, Medicina Oral, Patologia Oral, Radiologia Oral e Endodontologia.* 2: 155-60. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.120051>.
- Viana, R. B et al. (2002). Influência da gestação e puerpério no leucograma de cabras Saanen criadas no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia.* 39: 196-201. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000400006>.
- Zhang, Y e outros. (2015). Atividade antimicrobiana de nanopartículas de ouro e ouro iônico. *Journal of Environmental Science and Health, Parte C*, v. 33, n. 3, p. 286-327. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1055161>.
- Zhishen, J, Mengcheng, T & Jianming, W. (1999). A determinação de conteúdos de flavonoides em amoreira e seus efeitos de eliminação de radicais superóxido. *Química de alimentos.* 64:555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).
- Zielinski, D et al. (2020). Atividade biológica do extrato hidrofílico de *Chlorella*

IV - SUPLEMENTAÇÃO COM NÚCLEO MINERAL CONTENDO MINERAIS QUELATADOS PARA PREVENÇÃO DA MASTITE

Mineral core supplementation containing chelated minerals for mastitis prevention.

Artigo redigido conforme as normas da revista Acta Scientiarum Animal Sciences

Resumo: A mastite é uma inflamação na glândula mamária que afeta a produção de leite, sendo um problema significativo na produção leiteira. Este estudo avaliou a eficácia de um núcleo mineral contendo minerais quelatados na ativação do sistema imunológico, e melhoria da qualidade do leite por meio da redução da contagem de células somáticas para prevenção da mastite em vacas leiteiras. Foram utilizadas oito vacas das raças Holandesa e Jersey, em um delineamento *cross-over* de 28 dias, comparando-se os tratamentos: T1 núcleo mineral contendo minerais quelatados e T2 núcleo mineral controle. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para contagem de células somáticas, contagem de aeróbios mesófilos, composição físico-química do leite e hemograma entre os tratamentos ($p > 0,05$). No entanto, a produção de leite foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com minerais quelatados. Observou-se efeito do período para as variáveis de gordura ($p < 0,015$) e condutividade elétrica ($p < 0,023$), bem como efeito dos dias para densidade ($p < 0,049$), proteína ($p < 0,046$) e contagem de aeróbios mesófilos no leite aos 28 dias ($p < 0,026$). Com relação ao hemograma, não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados ($p > 0,05$). Porém, houve interação entre tratamento e período para as variáveis: plaquetas ($p < 0,048$), leucócitos ($p < 0,006$), segmentados ($p < 0,039$) e basófilos ($p < 0,013$) e entre dia e período para a variável segmentados ($p < 0,013$). O suplemento mineral contendo minerais quelatados aumentou a produção de leite, porém não houve diferença significativa para a contagem de células somáticas e na ativação do sistema imune.

Palavras-chave: sistema imunológico; quelatos; qualidade de leite; contagem de células somáticas.

Abstract: Mastitis which is mammary gland inflammation that affects milk production and is a significant problem in dairy production. This study evaluated the effectiveness of a mineral core containing chelated minerals in activating the immune system, improving milk quality through reducing somatic cell counts for preventing mastitis in dairy cows. Eight Holstein and

Jersey cows were used in a 28-day cross-over design, comparing the treatments: T1 mineral core containing chelated minerals and T2 mineral core control. There were no significant differences between treatments for somatic cell count, mesophilic aerobic count, physical-chemical composition of milk and blood count between treatments ($p > 0.05$). However, milk production was significantly higher ($p < 0.05$) in the group treated with chelated minerals. A block effect was observed for the variables of fat ($p < 0.015$) and electrical conductivity ($p < 0.023$), as well as an effect of days for density ($p < 0.049$), protein ($p < 0.046$) and mesophilic aerobic count in the milk at 28 days ($p < 0.026$). Regarding the blood count, there was no significant difference between the evaluated treatments ($p > 0.05$). However, there was an interaction between treatment and block for the variables: platelets/ μl ($p < 0.048$), leukocytes/ μl ($p < 0.006$), segmented% ($p < 0.039$) and basophils% ($p < 0.013$) and between day and block for the segmented variable ($p < 0.013$). The mineral supplement containing chelated minerals increased milk production, but there were no significant differences in somatic cell count and immune system activation.

Key words: immune system; chelates; milk quality; somatic cell count.

INTRODUÇÃO

A suplementação de minerais na dieta de vacas leiteiras desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde, no desempenho produtivo e na qualidade do leite. Dentre as formas disponíveis, os minerais quelatados vêm ganhando destaque devido à sua maior biodisponibilidade e eficiência na absorção pelo organismo animal, melhorando a assimilação e fortalecendo o sistema imunológico, auxiliando na saúde da glândula mamária, reduzindo a CCS e favorecendo a produção de leite, visto que menores contagens de células somáticas implicam em menor incidência de mastite clínica no rebanho e melhor qualidade do leite (AAFCO, 2000). Diferente dos minerais inorgânicos, os quelatados são ligados a moléculas orgânicas, como aminoácidos ou proteínas, o que reduz a interferência de fatores antagônicos no trato digestivo e melhora sua utilização metabólica (Mottin et al., 2013).

Estudos indicam que a suplementação com minerais quelatados pode contribuir significativamente para o fortalecimento do sistema imunológico das vacas leiteiras, favorecendo a resposta inflamatória e reduzindo a incidência de doenças como a mastite. Como consequência, observa-se uma redução na contagem de células somáticas (CCS) no leite, um parâmetro amplamente utilizado para avaliar a saúde da glândula mamária. Além disso, a melhor absorção dos minerais está associada a benefícios como aumento da produção

de leite, melhora na reprodução e maior resistência ao estresse oxidativo (AAFCO, 2000; Franco et al, 2018; Nasem, 2021).

Andrieu (2008) observou que a metionina de zinco orgânico aumentou a produção de leite e reduziu a CCS, contribuindo para a saúde mamária. Banadaky et al. (2021) sugeriram que minerais orgânicos têm maior efeito na produção durante o pico de lactação em comparação aos outros estágios. Diante disso, este estudo se propõe a avaliar a eficácia de núcleo mineral contendo minerais quelatados na dieta de vacas leiteiras visando avaliar seu efeito sobre o status imunológico dos animais e redução de CCS do leite, diminuindo assim, a incidência de mastite clínica e subclínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de condução do experimento

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM), da Universidade Estadual de Maringá, localizada no distrito de Iguatemi, no Município de Maringá – PR (23°21'S, 52°04'W, altitude de 564 m). A pesquisa foi realizada no setor de Bovinocultura de Leite e no Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia de Leite (CMETL). Todos os procedimentos experimentais receberam aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA/UEM), sob o Protocolo nº 8566131123.

Ensaio in vivo em bovinos lactantes para prevenção de mastite utilizando núcleo mineral via ração

Foram utilizadas oito vacas das raças Holandesa e Jersey, com peso médio de 500 kg e produção média de 20 litros/dia, em diferentes fases de lactação, mantidas em pastagem (capim estrela) e suplementadas com silagem de milho (30 kg/cab/dia) e concentrado de grão de milho (8 kg/cab/dia). O experimento foi realizado durante os meses de janeiro e fevereiro (época das águas). A dieta experimental continha, em percentual da MS 40 % de milho seco moído, 38 % de farelo de soja e 17 % farelo de trigo.

Tabela 1. Composição química (% MS) da silagem de milho (SM), milho moído (MM), farelo de trigo (FT), farelo de soja (FS), ração convencional, núcleo mineral (C) e núcleo mineral contendo minerais quelatados (T) para vacas em lactação

Componente	Unidade	SM	MM	FT	FS	Ração	C	T
Matéria seca	%	36,94	86,52	89,58	88,99	88,01	99,28	99,10

(MS)								
Matéria mineral (MM)	% da MS	3,96	1,27	5,92	6,76	3,93	88,58	86,58
Matéria orgânica (MO)	% da MS	96,04	98,73	94,08	93,24	96,07	11,42	13,42
Proteína bruta (PB)	% da MS	7,67	8,90	17,78	47,70	24,47	1,12	1,22
Extrato etéreo (EE)	% da MS	3,19	4,52	3,48	2,93	1,86	0,51	0,34
Fibra detergente neutro (FDN)	% da MS	39,74	17,12	42,53	20,56	19,51	-	-
Fibra detergente ácido (FDA)	% da MS	22,06	4,90	14,27	11,18	8,20	-	-
Energia bruta (EB)	Mcal/kg MS	4.515,48	4.474,72	4.589,76	4.766,99	4.564,14	-	-

Controle = calcário calcítico, palatabilizante de melaço e aromatizante de baunilha; Teste = calcário calcítico, sulfato de cobre, sulfato de zinco, selenito de sódio, selênio quelatado, cobre quelatado, zinco orgânico, vitamina E, niacina (vitamina B₃), palatabilizante flavonizante, antioxidante (B.H.T.).

A análise da composição mineral do núcleo contendo minerais quelatados e do núcleo controle foram realizadas a partir da obtenção da matéria mineral (MM), ou cinzas. Para isso, preparou-se uma solução mineral dissolvendo as cinzas do cadinho em uma solução de ácido clorídrico (HCl) na proporção 1:1, com o objetivo de solubilizar os minerais presentes. Após o preparo da solução, realizou-se a avaliação individual dos minerais, incluindo cálcio, cobre e zinco. Com base nas diluições da solução padrão, foi elaborada uma curva de calibração que relacionou a concentração dos minerais com a absorbância, conforme as recomendações de Silva et al. (2002) e Detmann et al. (2012).

Ambos os núcleos foram homogeneizados em um balde com aproximadamente 200 g de concentrado. Após essa etapa, a mistura foi incorporada à silagem e o restante do concentrado, que foi então fornecido aos animais. O núcleo mineral contendo minerais quelatados e o núcleo controle ambos foram fornecidos no cocho na dose de 10g/cabeça/dia. A dieta foi formulada para atender ou exceder às exigências nutricionais de vacas leiteiras com produção média de 20 kg/dia de leite (Nasem, 2021). O delineamento utilizado foi *cross-over* sendo os tratamentos: T1 – núcleo contendo minerais quelatados e T2 – núcleo mineral controle. Ambos os grupos utilizaram iodo como pós-*dipping*. O período experimental foi de

28 dias por período, totalizando 63 dias, com sete dias de adaptação. O núcleo contendo minerais quelatados continha cálcio (min-max) 180-225 g/kg, cobre 3000 mg/kg, selênio 75 mg/kg, zinco 4250 mg/kg, cobre quelatado 3000 mg/kg, selênio quelatado 75 mg/kg, zinco orgânico 4250 mg/kg, niacina (vitamina B₃) 500 mg/kg, vitamina E 2200 UI/kg, O produto denominado núcleo controle continha calcário calcítico 2,69 g/cm³, palatilizante de melaço 0,2 % e aromatizante de baunilha 0,2 %.

Os animais foram ordenados mecanicamente duas vezes ao dia, sendo usado como pós-*dipping* solução à base de iodo. Para mensuração da produção leiteira houve o registro diário da quantidade de leite obtida por animal em ambas as ordenhas da manhã (06h30 min) e tarde (15h00 min).

Após a ordenha, os animais eram mantidos em canzil, onde cada um possuía um espaço individual para se alimentar. A dieta era fornecida à vontade, garantindo um fornecimento adequado de nutrientes, e a água estava sempre disponível para consumo *ad libitum*. Além disso, o ambiente contava com ventiladores para proporcionar conforto térmico, contribuindo para o bem-estar dos animais e auxiliando na manutenção da produtividade e saúde do rebanho.

Amostras de leite foram coletadas nos dias 0 e 28 para a contagem total de aeróbios mesófilos semeadas em Agar Plate Count (PCA), com incubação a 35 °C por 48 horas (Franco e Landgraf). A CCS e as análises de composição físico-química foram realizadas utilizando alíquotas do galão de ordenha após homogeneização. O leite foi mantido a 4 °C e analisado imediatamente. As análises de CCS foram realizadas com o uso do equipamento Ekomilk Scan - CapLab® e as de composição físico-química com o Ekomilk Total - CapLab®.

Coleta de sangue dos animais para hemograma completo

As amostras de sangue foram coletadas após a primeira ordenha da manhã por punção da veia jugular, utilizando agulhas descartáveis e tubos Vacuntainer® com EDTA. As amostras foram mantidas em caixa térmica com gelo até o transporte ao laboratório particular, onde, em até 24 horas, foi realizado o hemograma, incluindo contagem de hemácias, volume globular, hemoglobina, índices hematimétricos, contagem de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos, conforme as recomendações de Viana et al. (2002).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) foi determinada por meio do teste de Tukey usando o software SAS 9.3 (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em relação à análise da composição mineral dos núcleos, os resultados obtidos para o núcleo com minerais quelatados indicaram as seguintes concentrações: 0,007813 ppm de cálcio, 0,001522 ppm de cobre e 0,001564 ppm de zinco. Por outro lado, para o núcleo mineral controle, as concentrações observadas foram 0,059981 ppm de cálcio, 0,002740 ppm de cobre e 0,003272 ppm de zinco.

Não foram observadas diferenças significativas para CCS, contagem microbiológica de aeróbios mesófilos e na composição físico-química do leite entre os tratamentos ($p > 0,05$). No entanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de leite (Tabela 1). Observou-se efeito do período para as variações de gordura ($p < 0,015$) e condutividade elétrica ($p < 0,023$), bem como efeito dos dias para densidade ($p < 0,049$), proteína ($p < 0,046$) e contagem de aeróbios mesófilos no leite ($p < 0,026$) (Tabela 1). Além disso, houve interação entre tratamento e período para condutividade elétrica ($p < 0,029$) (Material Suplementar TS1), assim como interação entre tratamento e dia para a variável gordura ($p < 0,022$) (Material Suplementar TS2).

Os valores de CCS ficaram abaixo da recomendação da IN 76 ($5,70 \log_{10}$), sendo $5,27 \log_{10}$ UFC/mL para os animais que receberam núcleo mineral quelatados e $5,47 \log_{10}$ UFC/mL para o grupo controle. A composição físico-química do leite também atendeu às normas da IN 77/2020 (Brasil, 2020), sem haver diferença entre os tratamentos. A produção de leite aumentou significativamente com o uso de minerais quelatados, corroborando com Hackbart et al. (2010) os quais observaram aumento na produção de leite no pós-parto com suplementação orgânica de zinco, cobre, manganês e cobalto. Banadaky et al. (2021) também relataram resposta positiva na lactação de vacas holandesas primíparas suplementadas com minerais quelatados, especialmente durante o pico de lactação, evidenciando maior efeito dos minerais orgânicos nesse estágio em comparação a outros períodos.

Rabiee et al. (2010), verificaram ganhos de 0,93 kg/dia de leite, 0,04 kg/dia de gordura e 0,03 kg/dia de proteína com minerais orgânicos (zinco, manganês e cobalto), contudo, a CCS

do leite não apresentou redução significativa, similar ao presente estudo. O zinco destaca-se na nutrição de bovinos leiteiros por contribuir para o aumento da produção de leite e redução da CCS, graças ao seu papel em processos catalíticos, estruturais e reguladores. Este mineral é essencial para a queratinização e o metabolismo proteico, formando uma barreira de queratina no canal do teto, que protege contra infecções (Andrieu, 2008). No estudo de Banadaky et al. (2021), vacas suplementadas com zinco orgânico apresentaram menor contagem de células somáticas (CCS) e maior teor de gordura no leite. No entanto, os resultados do presente estudo diferem desses achados, uma vez que foi observada uma redução no teor de gordura e um aumento na condutividade elétrica do leite entre os períodos, sem impacto na CCS. Esse efeito pode estar relacionado ao papel essencial dos minerais na regulação do metabolismo e na funcionalidade ruminal das vacas. Minerais como cobre e zinco atuam como cofatores de diversas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. Quando fornecidos na forma de quelatos, essas fontes orgânicas apresentam maior biodisponibilidade, aumentando a eficiência das reações metabólicas. Isso pode influenciar a produção de componentes do leite, como a gordura, além de alterar parâmetros como a condutividade elétrica (Nasem, 2001; Nocek et al., 2007).

Os valores de densidade do leite de vaca variam entre 1.028 e 1.035 g/mL, dependendo de sua composição. A diminuição da densidade do leite observada, pode ser explicada pela redução do teor de gordura, uma vez que a gordura possui menor densidade em comparação aos outros componentes do leite. Além disso, outros fatores podem influenciar a densidade, como variações nos teores de proteína e lactose, além da presença de água ou infecções, como a mastite, os quais alteram a concentração de sólidos no leite. Dessa forma, a redução da densidade pode ser um indicativo de mudanças na composição do leite ou de possíveis problemas de qualidade (Brasil, 2018).

O aumento da proteína no leite após o fornecimento de minerais quelatados sugere que os minerais desempenham um papel importante na melhoria da saúde e nutrição das vacas. A suplementação adequada de minerais tem sido associada a melhorias na saúde geral dos animais, o que pode impactar positivamente na síntese de proteínas no leite, como a caseína, um dos principais indicadores da qualidade nutricional do leite. O fornecimento de minerais, especialmente os quelatados, pode melhorar a absorção e utilização de nutrientes essenciais, promovendo uma produção de leite de melhor qualidade (Santos e Ipharraguerre, 2017).

A diminuição na contagem de aeróbios mesófilos no leite aos 28 dias é um indicativo positivo de melhoria na saúde geral das vacas, resultando em uma menor carga microbiana no leite. Minerais quelatados podem fortalecer o sistema imunológico das vacas, ajudando a prevenir infecções bacterianas reduzindo a contagem de aeróbios mesófilos no leite. O crescimento desses microrganismos também pode ser indicativo de problemas de higiene ou de infecções, como a mastite. Sendo assim, essa diminuição na CBT pode indicar que o leite está mais higiênico e com menor contaminação bacteriana. Além disso, pode ser um sinal de que a suplementação de minerais quelatados promoveu uma melhora na saúde imunológica das vacas, resultando em menos infecções e melhor qualidade do leite produzido (Franco et al., 2018; Nasem, 2021).

Observou-se interação significativa entre tratamento e período, sendo observado para os animais que receberam núcleo controle maior valor de condutividade elétrica (5,598%) no período 1 (Material Suplementar TS1). Os valores de condutividade elétrica devem oscilar entre 4,0 e 6,5 ms/cm (Nasem, 2021), valores elevados indicam alterações na saúde do útero, sendo associados a mastite.

Na interação entre tratamento e dias de coleta, observou-se que os animais suplementados com minerais quelatados apresentaram maiores teores de gordura no leite aos 28 dias, atingindo 4,410%. Esse resultado sugere que a suplementação com minerais quelatados pode influenciar positivamente melhorando a digestibilidade da dieta. Essa elevação no teor de gordura pode estar relacionada a uma melhor eficiência nutricional, contribuindo para a qualidade do leite e potencializando a rentabilidade da produção láctea (Material Suplementar TS2).

Tabela 2. Contagem de células somáticas, composição físico-química e contagens microbiológicas do leite de vacas que receberam núcleo mineral via ração

Tratamento	CCS (células/mL)	Composição						
		G	ST	D	P	CO	LOG10 Leite	Prod_leite
Núcleo minerais quelatados	5,276 ^a	3,547 ^a	9,979 ^a	1,02396 ^a	3,411 ^a	5,536 ^a	2,833 ^a	14,98 ^a
Núcleo controle	5,470 ^a	2,900 ^a	9,859 ^a	1,02110 ^a	3,405 ^a	5,433 ^a	2,881 ^a	11,23 ^b
Período								
1	5,382 ^a	4,098 ^a	9,939 ^a	1,02799 ^a	3,585 ^a	5,569 ^a	3,122 ^a	12,86 ^a
2	5,363 ^a	2,349 ^b	9,899 ^a	1,01707 ^a	3,232 ^a	5,400 ^b	2,593 ^a	13,36 ^a
Dia								
1	5,325 ^a	3,179 ^a	9,593 ^b	1,01692 ^b	3,071 ^b	5,458 ^a	3,328 ^a	14,00 ^a
28	5,420 ^a	3,268 ^b	10,245 ^a	1,02814 ^a	3,745 ^a	5,512 ^a	2,386 ^b	12,22 ^a
SD	0,3151	1,900	3,520	15,351	0,907	0,196	1,027	4,150
P-valor								
Tratamento (A)	0,0946	0,3453	0,9849	0,6043	0,9846	0,1503	0,9049	0,0174*
Período (B)	0,8639	0,0156*	0,3296	0,0556	0,2828	0,0230*	0,1968	0,7363
Dia (C)	0,4051	0,8953	0,1608	0,0498*	0,0464*	0,4571	0,0266*	0,2382
Int. AxB	0,3126	0,4226	0,5525	0,3243	0,6526	0,0291*	0,4807	0,1046
Int. AxC	0,2065	0,0227*	0,3085	0,6786	0,8472	0,2910	0,9814	0,4027
Int. BxC	0,2837	0,8837	0,8518	0,2718	0,1407	0,0816	0,1044	0,6376
Int. AxBxC	0,3009	0,2828	0,8792	0,2727	0,8532	0,9574	0,3525	0,8266

CCS = contagem de células somáticas; Log10 Leite = contagem de aeróbios no leite; G = gordura (%); ST = sólidos desengordurados; D = densidade (kg/L); P = proteína (%); CO = condutividade (mS); Prod leite = produção de leite/L.

Com relação ao hemograma, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos avaliados (Tabela 2). Porém, houve interação entre tratamento e período para as variáveis: plaquetas/ μl ($p < 0,048$), leucócitos/ μl ($p < 0,006$), segmentados% ($p < 0,039$) e basófilos% ($p < 0,013$) (Material Suplementar TS3) e entre dia e período para a variável segmentados ($p < 0,013$) (Material Suplementar TS4).

Tabela 3. Análise dos Parâmetros Hematológicos de vacas utilizando núcleo mineral via ração

Tratamentos	Hemograma												
	HE	HEMO	HEMA V.C.M	CHCM		RDW	PLAQ	LEU	SEG	LIN	MON	EOS	BAS
Núcleo minerais quelatados	5,070 ^a	7,556 ^a	23,987 ^a	44,612 ^a	29,425 ^a	13,437 ^a	295,62 ^a	12,250 ^a	35,937 ^a	45,312 ^a	0,687 ^a	11,375 ^a	0,437 ^a
Núcleo controle	5,266 ^a	7,987 ^a	25,156 ^a	47,943 ^a	31,725 ^a	14,687 ^a	299,56 ^a	13,250 ^a	40,125 ^a	48,500 ^a	0,875 ^a	10,187 ^a	0,312 ^a
Período													
1	5,287 ^a	7,725 ^a	24,868 ^a	47,262 ^a	30,981 ^a	14,375 ^a	305,06 ^a	13,675 ^a	40,375 ^a	47,000 ^a	0,500 ^a	11,625 ^a	0,500 ^a
2	5,049 ^a	7,188 ^a	24,275 ^a	45,293 ^a	30,168 ^a	13,750 ^a	290,12 ^a	12,531 ^a	35,687 ^a	46,812 ^a	1,062 ^a	9,937 ^a	0,250 ^a
Dia													
1	4,846 ^a	7,006 ^a	22,837 ^a	44,412 ^a	28,718 ^a	13,500 ^a	269,68 ^a	11,731 ^a	38,187 ^a	42,937 ^a	0,625 ^a	11,562 ^a	0,437 ^a
28	5,490 ^a	8,537 ^b	26,306 ^a	48,143 ^a	32,431 ^a	14,625 ^a	325,50 ^a	14,475 ^a	37,875 ^a	50,875 ^a	0,937 ^a	10,000 ^a	0,312 ^a
SD	1,270	1,942	6,055	9,908	5,547	2,677	111,62	6,250	16,830	18,747	1,035	8,088	0,661
Tratamento (A)	0,6651	0,5360	0,5902	0,3511	0,2524	0,1991	0,9214	0,4476	0,4884	0,6349	0,6133	0,6817	0,5979
Período (B)	0,6009	0,8926	0,7839	0,5793	0,6824	0,5153	0,7084	0,6095	0,4386	0,9777	0,1376	0,5607	0,2957
Dia (C)	0,1651	0,0354*	0,1182	0,2974	0,0705	0,2462	0,1701	0,2264	0,9586	0,2428	0,4019	0,5899	0,5979
Int. Ax B	0,5858	0,3766	0,4366	0,4269	0,3981	0,4359	0,0484*	0,0063*	0,0398*	0,1081	0,0727	0,2949	
Int. Ax C	0,3711	0,3862	0,3580	0,4411	0,3582	0,3012	0,8644	0,6772	0,2310	0,1284	0,8659	0,2581	0,2957
Int. Bx C	0,7569	0,6340	0,7184	0,3547	0,2731	0,5153	0,3246	0,7478	0,0131	0,3320	0,8659	0,2581	0,5979
Int. Ax Bx C	0,3916	0,4260	0,3790	0,3935	0,4085	0,4359	0,9189	0,4950	0,1258	0,9628	0,6133	0,3146	0,2957

HE = eritrócitos; HEMO = hemoglobina; HEMA = hematócitos; VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW = largura de distribuição de hemácias; PLAQ = plaquetas; LEU = leucócitos; SEG = segmentados; LIN = linfócitos; MON = monófilos; EOS = eosinófilos; BAS = basófilos.

Os valores referência para bovinos leiteiros são: eritrócitos (5,00 a 10,00 milh/ μ l); hemoglobina (8,0 a 15,0 g/dL); hematócitos (24 a 46%); VCM (40 a 60 pg); CHCM (30 a 36%); plaquetas (100,000 a 800,000/ μ l); leucócitos (4,000 a 12,000/ μ l); neutrófilos segmentados (15% a 45%); linfócitos (45 a 75); monócitos (25 a 840/ μ l); eosinófilos (2 a 20); basófilos (0 % a 2%). Fonte: Schalm's Veterinary Hematology (2010).

Observou-se que embora tenham sido constatadas maiores contagens de leucócitos para os animais que receberam minerais quelatados na dieta (17,837 cels/uL) para os animais do período 2, excederam o valor referência que é de 4,000 a 12,000 células/ μ L (Material Suplementar TS3), o que poderia indicar ativação do sistema imunológico devido à resposta contra patógenos; as contagens para basófilos, outro tipo de leucócito relacionado à resposta alérgica e inflamatória (Radkowska; Herbut, 2014) os valores para esta variável permaneceram de acordo com os parâmetros recomendados 0 a 2 % (Material Suplementar TS3).

Foram constatados maiores valores para contagem de neutrófilos segmentados no sangue dos animais do grupo minerais quelatados (44,750 %) para o período 1, porém mantiveram-se no limite estabelecido (15 % a 45 %); (Schalm's Veterinary Hematology, 2010). Níveis elevados de neutrófilos segmentados indicam resposta inflamatória ou infecção bacteriana, como observado em casos de mastite, onde os neutrófilos desempenham papel essencial na defesa contra patógenos (Kirby et al., 2010). Para basófilos, foi constatado maiores valores para o núcleo mineral quelatado para o período 1 (0,875 %), porém mantendo-se no nível recomendado 0 a 2 % (Schalm's Veterinary Hematology, 2010).

Para a interação entre dia x período na análise do sangue para a variável neutrófilos segmentados %, observou-se que no dia 1, houve diferença significativa no percentual de segmentados entre os períodos, indicando que no período 2 o valor foi menor entre os períodos. Já aos 28 dias, os valores mantiveram-se semelhantes, mostrando que essa diferença inicial não se manteve ao longo do tempo.

Enfermidades em ruminantes, como a mastite, podem causar alterações nos glóbulos vermelhos e brancos, sendo o hemograma uma ferramenta útil para diagnóstico. Taylor (2000) observou que, em animais com mastite clínica, houve aumento nos índices leucocitários e de neutrófilos, com elevações de 31 % e 41,5 %, respectivamente, em comparação com animais saudáveis.

CONCLUSÕES

A suplementação com minerais quelatados não resultou na redução de células somáticas no leite. No entanto, observou-se um aumento na produção de leiteira, indicando um efeito positivo na eficiência produtiva dos animais. Desta forma, os

minerais quelatados podem contribuir para a melhoria do desempenho produtivo, mas seu impacto direto na saúde da glândula mamária e na redução das células somáticas pode depender da adoção de estratégias complementares de manejo e prevenção.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Universidade Estadual de Maringá pelo apoio, ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro por meio da bolsa e a empresa Nutriphós pela doação dos núcleos minerais.

REFERÊNCIAS

AAFCO - Association of American Feed Control Officials. Nutrients requirements for dogs, 2000. Disponível em: <https://www.aafco.org/>. Acessado em: 02 dez de 2024.

ANDRIEU, S. Existe um papel para suplementos de oligoelementos orgânicos na saúde de vacas em transição?. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 77-83, 2008.

BANADAKY, MD, RAJAEI-SHARIFABADI, H.; HAFIZI, M.; HASHEMI, SA, KALANAKY, S.; FAKHARZADEH, S.; ... & NAZARAN, MH. Respostas de lactação de vacas leiteiras holandesas à suplementação com uma combinação de minerais-traço produzidos usando a tecnologia avançada de compostos quelatos. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1-9, 2021.

BRASIL. *Instrução Normativa nº 77, de 21 de outubro de 2020*. Aprova o regulamento técnico para a produção, identidade e qualidade do leite. Diário Oficial da União, 22 out. 2020, Seção 1, p. 34, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 76, de 26 de setembro de 2018**. Disponível: <http://www.agricultura.gov.br>.

DETMANN, E. et al. Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco: MG, Suprema, 2012. 214p

FRANCO, G. L.; VEDOVATTO, M.; D'OLIVEIRA, M. C.; NETO, I. M. C.; DA GRAÇA MORAIS, M.; & DA SILVA DIOGO, J. M. Frequência de suplementação proteico-energética sobre o desempenho e comportamento ingestivo de bezerras Nelore

mantidos em pastagem tropical na estação seca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 6, p. 2555-2564, 2018.

HACKBART, KS.; FERREIRA, RM.; DIETSCH, AA.; SOCHA, MT.; SHAVER, RD.; WILTBANK, MC.; & FRICKE, PM. Effect of dietary organic zinc, manganese, copper, and cobalt supplementation on milk production, follicular growth, embryo quality, and tissue mineral concentrations in dairy cows. **Journal of animal science**, v. 88, n. 12, p. 3856–3870, 2010.

KIRBY, M. et al. *Haematology and serum biochemistry of dairy cattle: clinical applications*. **Journal of Dairy Science**, 2010.

LAMB, GC.; BROWN, DR.; LARSON, JE.; DAHLEN, CR.; DILORENZO, N.; ARTHINGTON, JD.; & DICOSTANZO, A. Efeito da suplementação de minerais traço orgânicos ou inorgânicos na resposta folicular, ovulação e produção de embriões em novilhas Angus superovuladas. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 3-4, p. 221-231, 2008.

MOTTIN, C., DO PRADO, I. N., CHEFER, D. M., EIRAS, C. E., & RIVAROLI, D. C. Suplementação com minerais quelatados em bovinos: uma revisão. **Revista Campo Digital**, v. 8, n. 2, 2013.

NOCEK, J. E.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J. The effect of trace mineral fortification level and source on performance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2679-2693, 2006.

NASEM, National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle. 8.ed. Washington, D.C., 2021.

RABIEE, AR.; LEAN, IJ.; STEVENSON, MA.; & SOCHA, MT. Efeitos da alimentação com minerais orgânicos na produção de leite e desempenho reprodutivo em vacas leiteiras lactantes: Uma meta-análise. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4239-4251, 2010.

RADKOWSKA, I.; & HERBUT, E. Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue em vacas leiteiras dependendo do sistema de manejo. **Animal Science Papers & Reports**, 32 (4), 2014.

SILVA, P. A.; DA SILVA, J. A. C.; DE OLIVEIRA COELHO, P.; & DE SOUZA JÚNIOR, E. Qualidade do leite uht comercializado em campos gerais, MG. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 13, n. 2, p. 415-423, 2015.

TAYLOR, J. A. Leukocyte responses in ruminants. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's Veterinary Hematology. 5 th ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins. cap. 57, p. 391-404, 2000.

VIANA, RB.; BIRGEL JUNIOR, EH.; AYRES, MCC.; BIOJONI, FDSM.; SOUZA, MDCCD.; BIRGEL, EH. Influência da gestação e do puerpério sobre o leucograma de caprinos da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 196-201, 2002.

SILVA, D.J. QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3 Ed. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 2002. 235p.

SANTOS, J. E. P.; IPHARRAGUERRE, I. R. Effect of trace mineral supplementation on dairy cattle health and milk composition. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 7, p. 5443-5457, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No agronegócio, as cadeias produtivas buscam investir continuamente na melhoria da qualidade dos seus produtos para atender às exigências dos consumidores. A cadeia do leite e seus derivados desempenham um papel essencial na alimentação global. No entanto, a mastite bovina destaca-se como uma das doenças mais recorrentes e preocupantes nas propriedades leiteiras, causando prejuízos na qualidade e produção do leite. Tradicionalmente, o seu tratamento baseia-se no uso de antibióticos, que podem deixar resíduos no leite, comprometendo a produção de lácteos e representando riscos à saúde humana. Ademais, a utilização contínua de antibióticos tem contribuído para o surgimento de cepas bacterianas resistentes, configurando uma ameaça crescente à saúde pública e à sustentabilidade das propriedades leiteiras.

Nesse contexto, a substituição de tratamentos convencionais por alternativas inovadoras, como a terapia fotodinâmica (TFD) associada a extratos naturais, demonstrou potencial antimicrobiano. Extratos como os de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*), óleo de copaíba (*Copaifera martii*) e *Chlorella vulgaris* possuem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, e, quando combinados à TFD, aumentam a eficácia do tratamento. Essa abordagem sinérgica reduz a dependência de antibióticos, minimizando o risco de resíduos químicos no leite e contribuindo para uma produção mais segura e sustentável.

Paralelamente, a suplementação com minerais quelatados também desempenha um papel crucial na saúde das vacas leiteiras, especialmente no manejo da mastite. A busca por alternativas sustentáveis e eficazes para o manejo da mastite bovina, como o uso da TFD associada a extratos naturais e a suplementação com minerais quelatados, reflete uma abordagem integrada que combina saúde animal, segurança alimentar e sustentabilidade. Essas práticas não apenas minimizam o uso de antibióticos, mas também promovem a saúde do rebanho, a qualidade do leite e a confiança dos consumidores, fortalecendo a cadeia produtiva do leite de forma ética e inovadora.

