



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO

Ana Paula Pereira Alves

**Soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como
alternativa para antissepsia de tetos de bovinos**

Petrolina-PE

2016

ANA PAULA PEREIRA ALVES

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF como requisito de obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos

Petrolina-PE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula Pereira Alves

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Mateus Matiuzzi da Costa, Doutor, UNIVASF

Rodolfo de Moraes Peixoto, Doutor, IF SERTÃO-PE

Raimundo Campos Palheta Júnior, Doutor, UNIVASF

Ao meu pai João Alexandrino Alves (in memoriam), todas as palavras são poucas para expressar a saudade que sinto neste momento.

À minha pequena e grande família: minha mãe Maria Amélia, e minhas irmãs Patrícia e Valéria, que não consigo encontrar palavras para descrever tamanha importância das mesmas nessa conquista e em toda a minha existência.

A Deus, pelo dom da vida.

Ao Orientador Professor Dr. Mateus Matiuzzi da Costa. Primeiro, gostaria de reconhecer tamanha competência profissional e a valorização pelos saberes dos alunos e depois agradecer pela orientação coerente. Ao senhor minha admiração e gratidão.

Ao Dr. Rodolfo Moraes de Peixoto, muito obrigada pela importante contribuição, sem a qual este trabalho não seria concluído, pois proporcionou cientificidade aos dados desta pesquisa, ao professor, minha honesta gratidão.

Ao Dr. Helinando Pequeno de Oliveira e ao servidor Silvio Alan, por terem cedido gentilmente um dos instrumentos essenciais à realização deste estudo, aos senhores meus sinceros agradecimentos e abraço fraterno.

À Dra. Michelline Lins, pela valiosa parceria e grande colaboração durante a realização do experimento, a você minha eterna gratidão.

Ao meu chefe Augusto Henrique da Costa que mostrou muita compreensão e parceria ao longo desses anos.

A Aécio José Duarte, pela amizade sincera de todos esses anos, sem o seu apoio, jamais poderia ter concluído esta etapa tão importante na minha vida.

Aos pesquisadores e estudantes Jennifer Figueiredo, Antônio Wilton, Vinicius Amorim, Dielson Vieira, Gracielle Alves, Davi Freire, Diego Castro, Danillo Sales, Renilson Souza, Laiane Magalhães, Thamásia Sá, Monique Monteiro e Werônica Rocha, pela disponibilidade e ajuda decisória na realização deste estudo. Recebam meu reconhecimento e meu agradecimento.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido e pela acolhida ao longo destes sete anos.

Aos professores curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido, por compartilharem com humildade seus conhecimentos, experiências e exemplos de vida, fazendo-me crescer como profissional e pessoa.

A todos mais uma vez, meu muito obrigado e votos de muita saúde e paz.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial das soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos (*in situ*), considerando a escassez de literatura a respeito do uso destes compostos na profilaxia de mastites. Primeiramente foram realizados ensaios de microdiluição e CBM (Concentração Bactericida Mínima) a fim de verificar a atividade antimicrobiana das soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata sobre 30 isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de casos de mastite. Todos os isolados apresentaram sensibilidade às duas soluções testadas, mas a solução de nitrato de prata apresentou menores valores de CBMs (97,65 a 3,05 µg/mL), quando comparada as CBMs da solução de óxido de zinco (6.250 a 97,65 µg/mL). Posteriormente, foram conduzidos os ensaios de antissepsia dos tetos (*in situ*) através da imersão dos mesmos nas soluções antimicrobianas testadas. Para isso, foram utilizados 40 tetos (n=40) oriundos de vacas abatidas, os quais foram divididos em 4 grupos de 10 tetos, destinados ao teste das soluções de óxido de zinco (3%), de nitrato e prata (1%) e seus respectivos controles. Os tetos foram submetidos à contagem de microrganismos mesófilos na superfície dos tetos (UFC/cm²) antes e após a imersão nas soluções testadas. Como resultado, todas as soluções (de óxido de zinco e de nitrato de prata) apresentaram significativa redução de UFC/cm² até aos 60 minutos após a imersão (M 10' a M 60'). A solução de nitrato de prata apresentou redução de UFC/cm² significativamente maior, quando comparado ao grupo testado com solução de óxido de zinco. Tais resultados corroboram com o potencial das soluções de óxido de zinco e nitrato de prata para utilização no *pré* e *pós-dipping* em vacas leiteiras.

Palavras-chave: Tetos. Antissepsia. Óxido de zinco. Nitrato de prata. Bovinos. Mastite.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the zinc oxide and silver nitrate solutions as an alternative antiseptic for cow teats (in situ), considering the lack in the literature about these compounds uses in mastitis prophylaxis. First microdilution tests and MBC (Minimal Bactericidal Concentration) were performed in order to determine the antimicrobial activity of zinc oxide and silver nitrate solutions over 30 *Staphylococcus* spp. isolates, obtained from cows with mastitis. All strains tested showed sensitivity to both solutions, but the silver nitrate solution had lower MBC values (97.65 to 3.05 µg/ml) compared with zinc oxide solution MBCs (97 to 6,250, 65 µg/ml). Subsequently, the antiseptic teat tests were conducted (in situ) by immersing the teats in same antimicrobial solutions tested in the first experiment. Therefore, 40 teats were used (n = 40) originating from slaughtered cows were divided into 4 groups of 10 teats, to test zinc oxide (3%) and silver nitrate (1%) solutions and their respective controls. The teats were submitted to mesophilic count on the teat surface (CFU/cm²) before and after immersion in tested solutions. As a result, all the solutions (zinc oxide and silver nitrate) had a significant reduction in CFU/cm² until 60 minutes after immersion (M 10' to 60 M'). Silver nitrate solution showed a reduction of CFU/cm² significantly higher compared to the group treated with zinc oxide solution. These results validate the potential use of zinc oxide and silver nitrate solutions in dairy cows as a pre- and post-dipping antiseptic.

Key-words: Teats. Antisepsis. Zinc oxide. Silver nitrate. Cattle. Mastitis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Considerações gerais sobre mastite	11
2.1.1 Prevenção e controle da mastite.....	14
2.1.2 Resistência bacteriana e mastite	16
2.2 Óxido de zinco	20
2.2.1 O óxido de zinco como agente antimicrobiano	21
2.2.2 Mecanismo de ação do óxido de zinco	25
2.2.3 Resistência microbiana ao óxido de zinco	26
2.2.4 Toxicidade.....	27
2.3 Nitrato de prata	28
2.3.1 Uso terapêutico dos compostos de prata.....	30
2.3.2 Emprego de compostos de prata como antimicrobiano	33
2.3.3 Mecanismo de ação da prata	35
2.3.4 Sistemas de entrega da prata	36
2.3.5 Resistência bacteriana à prata.....	37
2.3.6 Toxicidade da prata.....	38
3. REFERÊNCIAS	40
4. ARTIGO	55
ANEXO A: Certificado de Aprovação na Comissão de Ética e no Uso de Animais da UNIVASF	78

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população brasileira. O Brasil ocupou, em 2014, a segunda posição mundial com vistas ao efetivo de vacas ordenhadas, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), ficando atrás apenas da Índia, que possui o maior rebanho de bovinos do mundo. Do efetivo total de bovinos em 2014, 10,9% corresponde a vacas ordenhadas, um aumento de 0,5% comparado ao ano anterior, com as regiões Sudeste e Nordeste apresentando as maiores participações: respectivamente, 34,4% e 20,6% do total nacional (IBGE, 2014).

Como visto, a participação da região Nordeste no tocante à produção nacional é considerada expressiva, destacando-se o estado da Bahia que conta com o terceiro maior rebanho leiteiro do Brasil, contribuindo com 9,0% do total de vacas ordenhas no país (IBGE, 2014).

Apesar do visível incremento que vem ocorrendo, o leite oriundo de algumas criações continua a apresentar baixa qualidade microbiológica, tendo em vista as más condições higiênico-sanitárias, estado de saúde dos animais e cuidados inadequados com utensílios e equipamentos utilizados nos procedimentos de ordenha (SIMÕES, 2012).

Este cenário proporciona uma prevalência acentuada da mastite no rebanho, doença de natureza plurietiológica, que compromete o desempenho da atividade leiteira através de significativas reduções na produção e qualidade do leite, perdas pelo descarte de animais e custos com o tratamento (CONTRERAS et al., 2007; RADOSTITS et al., 2002).

Como a maioria dos casos de inflamação da glândula mamária é causada por infecção bacteriana. O plano de controle da mastite é provido de estratégias que visam diminuir a quantidade de potenciais agentes infecciosos (QUINN, et al. 2005), a exemplo do pré e pós-dipping constitui-se das mais eficazes estratégias de controle da mastite contagiosa e ambiental, existindo alguns desinfetantes que foram desenvolvidos para esta finalidade. Já foram verificadas variações no perfil de suscetibilidade e resistência a esses produtos por parte da bactéria, o que pode limitar a diversidade de agentes antimicrobianos eficazes destinados à antissepsia dos tetos (MEDEIROS, 2008; RAMALHO, 2012).

Alguns métodos alternativos de antissepsia de tetos vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos (ANDRADE, 2010; FACCIN, 2013; YOKOIA, 2010), pelos quais trazem como proposta a utilização de princípios ativos oriundos de material orgânico. Este experimento preconiza a utilização de compostos químicos inorgânicos, o óxido de zinco (ZnO) e nitrato de prata (AgNO₃) na antissepsia de tetos bovinos, cujos compostos químicos apresentam alta e ampla atividade bactericida, que poderão ser aproveitadas como opções no controle e prevenção da mastite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre mastite

A mastite é uma inflamação do parênquima da glândula mamária, que independentemente da causa, acarreta em distúrbios funcionais no quarto mamário afetado resultando na diminuição da produção de leite e alterações nas suas características físico-químicas, sensoriais e bacteriológicas (GERMANO, 2001; RADOSTITS et al., 2002).

Dada a peculiaridade da fisiopatologia da doença, a mastite se apresenta como uma problemática na atividade leiteira mundial, justificada pela redução na produtividade e qualidade do leite, pelas perdas econômicas como também, pelos riscos à saúde pública que ela representa (CONTRERAS et al., 2007). Somado a todos esses fatores, a sua alta prevalência nos rebanhos leiteiros mundiais, faz da mastite uma das enfermidades infecciosas mais importantes nos animais de produção (QUINN et al., 2005).

Do ponto de vista econômico, a ocorrência de mastite bovina é o fator que mais provoca perdas na cadeia produtiva do leite. Essas perdas são resultantes da redução na produção em quantidade e qualidade do leite e seus derivados, considerando ainda as perdas devido ao descarte prematuro de vacas, custos com fármacos e com serviços médico veterinários, além do aumento da mão de obra (BALLOU, 2012; RADOSTITS et al., 2002).

Tratando-se da redução da qualidade do leite ocasionada pela infecção da glândula mamária, Tozzetti et al. (2008) relatam que existem mudanças na composição do leite referente à redução de cálcio, fósforo, proteína e gordura, e aumento de sódio e cloro, conseqüentemente alterando suas características organolépticas, físicas, químicas e microbiológicas (GERMANO, 2001). Ocorrendo também, elevação no número de células microbianas com conseqüente aumento das células somáticas (leucocitárias e epiteliais), além de desequilíbrio salino, aumento no pH e diminuição da estabilidade das proteínas do leite; fatores estes que comprometem o rendimento e a qualidade dos produtos lácteos (BUENO et al., 2005).

Ao que se refere à saúde pública, existe uma estreita associação da bactéria *Staphylococcus* spp. com a mastite, originando uma grande preocupação com

relação à presença deste agente nos alimentos lácteos, já que foram citadas intoxicações alimentares em seres humanos associadas à mastite bovina. BALABAN e RASOOLY, 2000). Alguns estudos foram conduzidos no Brasil demonstrando a importância dos *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas responsáveis por toxinfecções alimentares (FAGUNDES E OLIVEIRA, 2004; SILVA e SILVA, 2005).

Por ser uma enfermidade multifatorial e plurietiológica, são diversificadas as causas da mastite compreendendo origens tóxica, traumática, alérgica ou metabólica, mas na maioria dos casos, a inflamação é resultante de uma infecção microbiana (bactérias, fungo, algas e vírus), sendo a infecção bacteriana de maior relevância, pois são responsáveis por 90% dos casos de mastite (LADEIRA, 2001; MCDUGALL et al., 2009; RADOSTITS et al., 2002).

Geralmente, a mastite é designada de acordo com a origem do microrganismo, adotando-se a denominação de mastite contagiosa quando ela é causada por bactérias que residem primariamente na glândula mamária da vaca, enquanto que a mastite ambiental está associada a microrganismos presentes no meio ambiente (FREITAS et al. 2005; QUINN, et al., 2005). Os microrganismos ambientais são considerados invasores oportunistas do úbere, estando disseminados em locais que apresentam esterco, urina, barro e matéria orgânica (BEAUDEAU et al., 2002).

Embora mais de 100 espécies microbianas tenham sido isoladas da glândula mamária da vaca (WATTS, 1998), um número relativamente pequeno é responsável pela maioria de casos de mastite. Os patógenos bacterianos frequentemente isolados a partir de vacas com mastite clínica são *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, sendo estes dois últimos considerados agentes da mastite contagiosa, pois se apresentam como principais microrganismos contaminantes da glândula mamária, além de *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (FREITAS et al., 2005; QUINN, et al., 2005).

Os *Staphylococcus* spp. são os agentes etiológicos mais isolados dos casos de mastite. Nesse grupo, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais prevalente em infecções de vacas leiteiras, além de produzirem processos infecciosos de difícil controle (BRITO et al. 2001; SPINOSA et al., 2006). O gênero *Staphylococcus* spp. foi categorizado em dois grandes grupos: coagulase positivo e coagulase negativo,

divisão embasada na capacidade de coagular o plasma sanguíneo através da produção de estafilo-coagulase (TAPONEN e PYORALA, 2009).

Em uma investigação realizada por Krewer (2013), observou-se uma prevalência de 49,1% do gênero *Staphylococcus* spp. – entre outros gêneros como *Corynebacterium* spp. e *Prototheca* spp., em casos de mastites clínicas e subclínicas de rebanhos bovinos dos estados de Pernambuco e Bahia.

No ano de 2008, Medeiros estimou a ocorrência de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. na etiologia da mastite bovina. Foram coletadas 1080 amostras de leite procedentes de 15 propriedades situadas em municípios de região metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco. Como resultado do estudo, das 1080 amostras analisadas, 740 (68,5%) foram positivas ao exame microbiológico e 340 (31,5%) foram negativas. Das amostras positivas, isolaram-se bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. em 291 amostras (39,3%), das quais 58,4% foram classificadas como *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), 28% como *Staphylococcus aureus* e 12,7% *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) (MEDEIROS, 2008). Tais resultados também demonstram a elevada participação do gênero *Staphylococcus* na etiologia das mastites bovinas na região estudada.

Contudo, é sabido que a infecção pelo gênero *Staphylococcus* spp. é a causa mais comum de mastite clínica e subclínica em vários rebanhos leiteiros, apesar de implementação de medidas de controle (BRITO et al., 2001). Tal ocorrência pode ser associada ao fato de que o *S. aureus* é capaz de colonizar a pele e o canal do teto, predispondo à infecção intramamária (QUINN, et al. 2005). Quanto à morfologia, os estafilococos apresentam a forma de cocos sendo gram-positivos, com aproximadamente um (01) micrômetro de diâmetro e que tendem a formar agrupamentos em arranjos semelhantes a cachos de uva, dando origem ao seu nome: *staphyle* que em grego significa cachos de uva, e a palavra *kokkos* que se traduz como grãos. Além de sua maioria ser anaeróbia facultativa e catalase positiva. São imóveis, oxidase negativas e não formam esporos (QUINN, 2005; TAPONEN e PYORALA, 2009).

Por se enquadrar no grupo das bactérias gram-positivas, os representantes do gênero *Staphylococcus* apresentam uma parede celular espessa que consiste quase que totalmente em um único tipo de molécula, o peptidoglicano, que é um

polissacarídeo responsável pela rigidez da membrana das bactérias (MADIGAN, 2010).

2.1.1 Prevenção e controle da mastite

As medidas apropriadas para prevenção e controle da mastite bovina diferem conforme o microrganismo causador, sejam de origem contagiosa ou ambiental. Para isso, é necessário que os principais patógenos causadores de mastite em uma propriedade sejam identificados a fim de formular estratégias de controle (QUINN, et al. 2005).

As estratégias de controle da mastite baseiam-se em medidas preventivas tais como utilização de substâncias germicidas nos tetos antes e após a ordenha; antibioticoterapia no período de secagem; eliminação de casos crônicos; tratamento de casos clínicos durante a lactação e o adequado funcionamento dos equipamentos de ordenha (COSTA et al., 1999).

Embora o plano de controle da mastite bovina seja provido de diversas estratégias, a imersão do teto após a ordenha, prática denominada de pós-dipping, é a principal medida de controle para mastite contagiosa, enquanto que a imersão antes da ordenha - pré-dipping, é responsável pela redução da incidência de mastite ambiental (FONSECA e SANTOS, 2001; QUINN, et al., 2005).

O procedimento de *pré-dipping*, consiste na utilização de uma solução desinfetante com uma concentração menor que na solução utilizada no pós-ordenha, para redução da contaminação bacteriana (hipoclorito de sódio a 2% ou iodo a 0,3% ou, ainda, clorexidine a 0,3%) (SILVA et al., 2008).

Com a redução da carga bacteriana existente na pele do teto, diminui-se a incidência de infecções intramamárias, principalmente aquelas causadas por patógenos ambientais, visto que um dos mecanismos de transmissão desse tipo de mastite é a entrada do agente, que está na pele, para o interior do teto durante a ordenha (SILVA et al., 2008; QUINN, et al. 2005).

Foi observada uma redução na incidência de mastites causadas por patógenos ambientais com uso do *pré-dipping* em até 50%. É por esse motivo que a prática de *pré-dipping* também se constitui em uma medida importante para melhoria da qualidade do leite com redução da contagem do número de células somáticas (FONSECA e SANTOS, 2007; SILVA et al., 2008).

Outra prática muito importante de controle de novas infecções intramamárias é a desinfecção dos tetos ao final da ordenha, o *pós-dipping* (COSER, LOPES E COSTA, 2012). Esse procedimento tem como finalidade diminuir a contaminação dos tetos após a ordenha, especialmente para controlar a mastite contagiosa. A solução utilizada para *pós-dipping* geralmente contém uma substância para desinfecção e um emoliente. O uso de germicida após a ordenha é a melhor forma de reduzir a microbiota do teto sem deixar resíduos no leite (SILVA et al., 2008; FONSECA e SANTOS, 2001).

Um número limitado de antissépticos químicos pode ser usado na lavagem de tetos: compostos liberadores de cloro, iodóforos, compostos quaternários de amônia, gluconato de clorexidine. A limitação da diversidade de antissépticos disponíveis está relacionada ao cumprimento de vários critérios para seu uso seguro e eficaz. Tais critérios compreendem não ser irritantes nem tóxicos; devem permanecer ativos na presença de material orgânico; não devem ser absorvidos pelos tecidos e não deixar resíduos no leite. Além de apresentar estabilidade na pele e ter custo acessível (PEDRINI e MARGATHO, 2003).

A emergência de bactérias resistentes a múltiplas drogas que causam mastite têm complicado a gestão da patologia nos rebanhos leiteiros, dificultando intervenções preventivas e de tratamento (BHASME et al., 2013). Assim, faz-se necessária a análise frequente da eficácia dos agentes germicidas empregados rotineiramente nas propriedades leiteiras.

Uma pesquisa realizada por Medeiros em 2008, verificou a sensibilidade *in vitro* de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. frente a alguns desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping em vacas leiteiras. Foram testados um total de 60 isolados de *Staphylococcus* spp recuperados de glândulas mamárias de vacas com mastite subclínica procedentes de algumas regiões de Pernambuco. O estudo da eficácia dos desinfetantes utilizados no pré e pós-dipping foi realizado utilizando-se os seguintes princípios ativos: cloro (2,5%), iodo (0,57%), clorexidine (2%), e amônia quartenária (4,0%) em quatro tempos distintos (15", 30", 60" e 300"). Observou-se que 100% dos *Staphylococcus aureus* foram sensíveis ao iodo, 93,3% a clorexidine, 80% sensíveis a amônia, no tempo 60" (MEDEIROS, 2008). No ano de 2012, Ramalho et al. também conduziram um experimento com o propósito de analisar a sensibilidade de *Staphylococcus* spp. frente a desinfetantes comerciais utilizados em procedimentos de pré e pós-dipping. Analisou-se um total de 97

isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de vacas com mastite, do estado de Alagoas. Observou-se que 56,3% de *Staphylococcus aureus* foram sensíveis ao iodo, 68,8% sensíveis ao cloro, 87,5% à clorexidine e 37,5% ao composto de amônia no tempo de 60”.

É valido ressaltar que os resultados encontrados por Ramalho (2012) e sua equipe demonstraram uma menor incidência de isolados susceptíveis aos antissépticos quando comparado aos dados obtidos por Medeiros (2008). Isso comprova a existência de variações no perfil de sensibilidade e resistência dos microrganismos envolvidos nos processos infecciosos da glândula mamária de animais de produção leiteira, principalmente quando se trata de mastite causada por *S. aureus*, devido a prováveis fatores de virulência relacionados ao processo de infecção; da importância de diferentes reservatórios deste patógeno e do mecanismo de dispersão (ZADOKS, et al. 2002).

A provável existência de variações na suscetibilidade e na resistência dos agentes etiológicos da mastite acarreta a necessidade novos agentes antibacterianos para introdução de programas de controle de mastite bovina (CARDOZO et al., 2014). Por esse motivo, os métodos alternativos de tratamento e prevenção contra mastite vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos. (ANDRADE, 2010; FACCIN, 2013; YOKOIA, 2010).

Andrade (2010) obteve uma considerável redução do Log UFC/cm² de bactérias mesófilas nas superfícies dos tetos ao experimentar extrato de própolis como uma alternativa agroecológica no procedimento de pré e pós-dipping em vacas leiteiras, no estado do Paraná. No mesmo ano, Yokoia (2010) utilizou as propriedades antibacterianas e cicatrizantes do muco de escargots *Achatina* sp. no pré e pós dipping de vacas leiteiras. Como resultado, o muco de scargots mostrou ser igualmente eficiente no controle da população dos microrganismos presentes na superfície do teto, quando comparado ao uso de solução de iodo. Por último, em 2013, Feccin propôs que o extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*), poderia ser utilizado como substituto do iodo comercial na antissepsia dos tetos de vacas antes e após a ordenha (FECCIN, 2013).

2.1.2 Resistência bacteriana e mastite

O surgimento de resistência a drogas antimicrobianas e sua disseminação entre as bactérias continuam sendo um grande problema para medicina humana e

veterinária, situação agravada pelo uso frequente e indiscriminado de antibióticos, os quais atuam como agentes seletivos favorecendo aos microrganismos resistentes (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; MOTA et al. 2012). MADIGAN (2010) conceitua resistência aos fármacos antimicrobianos como a capacidade adquirida por um organismo de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico, ao qual ele é normalmente susceptível. O microrganismo passa a desenvolver mecanismos de resistência para neutralizar ou destruir um antibiótico.

No caso particular de patógenos da mastite, Martin (2002) afirmou existir internacionalmente um aumento da resistência bacteriana aos antibióticos vulgarmente usados no seu tratamento. Por exemplo, o referido pesquisador apontou um estudo de *S. aureus* isolados a partir de diferentes rebanhos leiteiros na Finlândia, o qual demonstrou um aumento na resistência de 36,9% para 63,6% entre 1988 e 1995.

Alguns estudos no Brasil também apontaram aumento expressivo no nível de resistência de patógenos causadores de mastite. A citar o trabalho liderado por Corrêa et al. (2005), certificando que todos os isolados de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) obtidos a partir de leite bovino apresentaram-se resistentes a pelo menos uma das drogas testadas, com destaque para sulfonamida (80,2%) e para ampicilina (78,9%). Machado et al. (2008) documentaram resistência a 16 princípios ativos simultaneamente em 27,5% dos *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) oriundos de vacas com mastite.

Considerando que a mastite estafilocócica é mundialmente a forma mais comum de mastite bovina (Quinn, et al. 2005) somado ao fato da crescente resistência do gênero *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos (SAMPIMON et al., 2011), torna-se importante abordagens a respeito dos mecanismos de resistência desenvolvidos por este grupo bacteriano, tais como inativação da droga por meio da enzima beta-lactamase; alteração do sítio de ação do antibiótico; bombas de efluxo e formação de biofilme.

As bombas de efluxo são proteínas que bombeiam ativamente os antimicrobianos do meio intracelular para o ambiente extracelular das células, contribuindo significativamente para a multirresistência bacteriana. Essas proteínas são codificadas por genes cromossomais *msrA/B/C* cuja expressão é regulada por um operon (KUMAR e SCHWEIZER, 2005; WEBBER e PIDDOCK, 2003). Tais genes foram encontrados em *Staphylococcus aureus* oriundos de vacas com mastite

(WANG et al., 2008) e em *Staphylococcus epidermidis* de origem bovina (SAWANT et al., 2009).

Outro mecanismo de defesa desenvolvido em *Staphylococcus* spp. é a capacidade de hidrolisar a ligação amida do anel beta-lactâmico dos antibióticos, através da enzima beta-lactamases, sintetizada através da expressão do gene *blaZ* (LOWY, 2003). Foi descoberta a existência de três linhas evolutivas destes genes em *Staphylococcus aureus* e em *Staphylococcus* coagulase negativa de bovinos (OLSEN et al., 2006).

O gene *mecA* confere outro mecanismo de resistência aos *Staphylococcus* spp. através da expressão da síntese de uma proteína de ligação a penicilina alterada, denominada PBP 2a., sintetizando uma parede celular resistente a ação de um antimicrobiano beta-lactâmico. Este gene é conservado em todas as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina e à oxacilina e é considerado o responsável pela resistência a estas drogas neste gênero (KONEMAN et al., 2008).

Seixas e colaboradores (2014) avaliaram a distribuição de estafilococcus resistência à meticilina entre 204 isolados obtidos de casos de mastite clínica e subclínica de vacas leiteiras de Portugal. Dos 204 isolados, 19 (9,3%) foram classificados como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), nos quais a presença do gene *MecA* foi confirmada. Ocorrência semelhante foi encontrada por kumar et al. (2010), ao atestar 10,2% de MRSA oriundos de leite bovino. Apesar da baixa prevalência do MRSA, Seixas et al. (2014) atestaram que seu estudo indicou que estes microorganismo vinham providos de outros mecanismo de virulência, como por exemplo, a capacidade de formação de biofilme, pela qual foi identificada em 84,2% dos MRSA isolados.

Madigan (2010) define biofilme como células bacterianas aderidas a uma superfície, envoltas por uma matriz adesiva excretada pelas células. A matriz geralmente é uma mistura de polissacarídeos, podendo conter proteínas e, até mesmo, ácidos nucléicos. Esta substância permite que as células bacterianas se aglomerem em multicamadas, tornando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos (ANTUNES et al., 2007; DANTAS et al., 2008; MELCHIOR et al., 2006). São por estas razões que o biofilme é considerado como mais uma ferramenta de patogenicidade dos agentes microbianos, especialmente no grupo bacteriano estafilocócico, e vem sendo proposto como um importante

elemento na persistência de infecções intramamárias (OLSON et al., 2002; TREMBLAY et al., 2013).

Uma das principais razões para a resistência aos antibióticos e recorrência de infecção é a formação de biofilme bacteriano no interior do úbere (OLSON et al., 2002). Uma pesquisa foi realizada com a finalidade de investigar a capacidade de formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* recuperados de mastite subclínica bovina utilizando o método estático tradicional e outro baseado em citometria de fluxo utilizando o leite como meio. Como resultado, apenas seis (20%) estirpes bacterianas formaram biofilme em condições de citometria de fluxo com leite. A formação de biofilme neste grupo foi significativamente associada a complexos clonais tipicamente detectados em mastite bovina, CC479, CC705, e CC97 (SNEL, MALVISI e PICCININI, 2014).

Atulya 2014 et al. (2014) elucidaram os efeitos de algumas características físico-químicas do leite sobre a formação de biofilme e a persistência da infecção. A produção de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram avaliadas pela técnica de violeta de cristal. Observou-se que a redução do pH no leite teve um efeito significativo sobre a formação de biofilme por *P. aeruginosa* (NCIM 5029). Foi postulado que a concentração de íons hidrogênio provoca um efeito negativo significativo sobre a formação de biofilme por *P. aeruginosa*. Assim, um decréscimo no pH irá propiciar a formação de biofilme. Por isso, os autores alertam sobre os uso de antimicrobianos intramamários altamente ácidos como as penicilinas naturais ou sintéticas, recomendando a co-administração de óxido de magnésio ou bicarbonato de sódio para reduzir a persistência da infecção (ATULYA et al., 2014).

Como visto, os micro-organismos dispõem de diversos mecanismos que lhe conferem resistência contra antimicrobianos utilizados para o tratamento de mastite. Como resultado dessa resistência intrínseca ou adquirida pelos microrganismos, uma problemática que parecia estar resolvida tem se transformado em uma enorme adversidade. O aumento da resistência aos antibióticos tem diminuído drasticamente o arsenal de drogas disponíveis. Portanto, uma busca contínua por novos fármacos deve ser realizada (ROCHA et al., 2011).

Partindo dessa premissa, alguns métodos alternativos de tratamento e prevenção contra mastite vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos. (ANDRADE, 2010; FACCIN, 2013; YOKOIA, 2010). Porém, todos estes estudos

partem de princípios ativos de materiais orgânicos, como por exemplo, muco de escargots *Achatina* spp.; extrato de própolis e da planta Aroeira. Este experimento preconiza a utilização de compostos químicos inorgânicos, o óxido de zinco (ZnO) e nitrato de prata (AgNO_3) na antissepsia de tetos bovinos, cujos compostos químicos ainda não tinham sido testados para esta finalidade.

Os compostos inorgânicos se apresentam como promissores antimicrobianos, pois são mais seguros e extremamente estáveis em relação aos antibióticos orgânicos (JALAI et al. 2010). Segundo Danial e Yousef (2012), a vantagem de utilizar óxidos inorgânicos como agentes antimicrobianos é que eles contêm elementos minerais essenciais ambientalmente seguros para os seres humanos e exibem uma forte atividade, mesmo quando administrados em pequena quantidade.

2.2 Óxido de zinco

O óxido de zinco é um composto inorgânico representado pela fórmula química ZnO, considerado inodoro e insípido. Ele geralmente aparece como um pó branco, mas se torna amarelo quando aquecido. É praticamente insolúvel em água, tem caráter anfótero e se dissolve em ácidos formando sais. O pó é largamente utilizado como aditivo em vários materiais e produtos, principalmente borracha (diminui o tempo de vulcanização), tintas, pomadas e, é também a matéria-prima para obtenção de outros compostos (zinco metálico, estearato de zinco, e palmitato de zinco (LEE, 2000).

Feltrin (2010) fez um levantamento sobre óxido de zinco e afirma que esse composto caracterizou-se como um importante material industrial ao longo do tempo e atualmente vem sendo objeto de interesse considerável, por apresentar uma combinação de propriedades físicas (relativa condutividade elétrica e térmica, absorção óptica no ultravioleta e estabilidade em temperaturas elevadas), químicas (estabilidade em pHs neutros) e biológicas (ação antibacteriana).

Em relação à propriedade antibacteriana do ZnO, no final da década de 40, cientistas como Bartels (1947) iniciaram uma investigação sobre ZnO como um composto antibacteriano. Porém, as pesquisas com este composto como um agente antimicrobiano somente se intensificaram por volta de 1995, quando Sawai e outros pesquisadores descobriram que o MgO (óxido de magnésio), CaO (óxido de cálcio) e ZnO (óxido de zinco) em pó exerciam atividade antibacteriana contra algumas estirpes de bactérias (SAWAI et al., 1995). Na mesma época, mais experimentos

foram executados com intuito de averiguar a atividade antibacteriana dos óxidos metálicos, incluindo o óxido de zinco (SAWAI et al, 1996, 1997, 1998, 2003).

Na farmacêutica humana, o óxido de zinco é tido como antisséptico, adstringente, secativo e anti-inflamatório. Usado também para aumentar o fator de proteção solar. Por via tópica atua como protetor hidrossolúvel, já que se fixa perfeitamente à pele formando uma película frente aos agentes externos. Tem grande capacidade de absorção de secreções da pele, apresentando ação antisséptica e adstringente suave. Considerando essas propriedades, o óxido de zinco é indicado no tratamento de eczemas, escoriações e hemorróidas. Como também é empregado como cicatrizante em úlceras e queimaduras. Para essas finalidades, o óxido de zinco é utilizado sobre diversas apresentações farmacêuticas, cremes, loções, pastas aquosas e talcos, em diferentes concentrações (BATISTUZZO, 2006).

Na farmacologia veterinária, as propriedades do óxido de zinco também são consideradas, sendo utilizado rotineiramente em formulações de unguentos, com indicação de uso na cicatrização de umbigos de recém-nascidos, eczemas, úlceras varicosas, pruridos e nos pequenos ferimentos causados por pequenas cirurgias, tosquias, descornas, marcações, arranhaduras e castrações (SPINOSA, 2006).

2.2.1 O óxido de zinco como agente antimicrobiano

No tocante a propriedade antimicrobiana do óxido de zinco, vários autores citam estudos ressaltando seus efeitos, seja na escala micrométrica, ou na escala nanométrica, haja visto que, segundo Feltrin (2010), o tamanho da partícula e a morfologia exerce significativa influência nas suas propriedades.

Após o estudo conduzido por Bartels (1947), Sawai e sua equipe, a partir da década de 90, intensificaram investigações a respeito do potencial de óxido de zinco como antimicrobiano, além de outros pesquisadores prosseguiram com estudos que validaram o poder antimicrobiano do óxido de zinco (SAWAI et al., 1995).

Soderberg (1990) verificou que as bactérias gram-positivas são mais susceptíveis ao óxido de zinco, comparada às bactérias gram-negativas. Estas não foram inibidas mesmo sendo submetidas a altas concentrações, ao tempo em que isolados de *S. epidermidis* exibiram uma notável sensibilidade ao ZnO.

Sawai (2003) demonstrou atividades antibacterianas de óxidos metálicos em pó (ZnO, MgO e CaO) contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, através

análise da condutividade elétrica do meio de crescimento causado pelo metabolismo bacteriano – ensaio condutimétrico. Nesse estudo o CaO apresentou-se como o mais eficaz contra a *E. coli*, seguido de MgO e ZnO. Além disso, o mesmo estudo apontou que o ZnO foi o mais eficaz para o *S. aureus*, e os autores sugeriram que esse composto tem uma forte afinidade para as células de *S. aureus*.

Para enfatizar a afinidade do *Staphylococcus* com o óxido de zinco, aponta-se a eficácia desse composto no tratamento de dermatite atópica em humanos causada por *S. aureus*, cuja terapêutica com óxido de zinco vem sendo utilizada com sucesso. A eficácia de ZnO para a dermatite atópica pode depender da forte afinidade entre ZnO e *S. aureus* (AKIYAMA et al., 1998). O Formulário Nacional de Farmacopeia Brasileira (2012) traz o óxido de zinco como componente de formulações farmacêuticas (cremes, loções, pomadas, pasta d'água) com indicações para tratamentos de afecções dermatológicas, agindo como antisséptico, secativo e adstringente.

Na medicina veterinária, especialmente no Brasil, a aplicação do óxido de zinco como antibacteriano é pouco usado, apresentando-se geralmente em formulações de unguentos, no qual exerce, dentre outras, ação antimicrobiana em afecções da pele (SPINOSA, 2006). Alguns países da União Europeia adotam doses farmacológicas do óxido de zinco na suinocultura para combater a diarreia pós-desmame e melhorar o desempenho animal (CAVACO, HASMAN, AARESTRUP, 2011; PETTIGREW, 2006).

Na investigação das propriedades antimicrobianas do óxido de zinco para possíveis aplicações futuras na medicina veterinária e na produção animal, Alves (2013) realizou um trabalho com o objetivo de avaliar a ação antibacteriana do óxido de zinco frente a isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de mastite caprina e bovina. Através da técnica de microdiluição em placas e CBM (Concentração Bactericida Mínima) foi possível observar que os isolados exibiram alta sensibilidade ao óxido de zinco, permitindo o avanço de estudos mais aprofundados para introdução desse agente na medicina preventiva da mastite em animais de produção.

Compostos de metal contendo óxido de zinco são amplamente utilizados em suplementos alimentares na produção animal para prevenção de doenças diarreicas. No entanto, as concentrações utilizadas na alimentação podem ser diferenciadas entre países, devido a restrições impostas pela legislação nacional

(CAVACO, HASMAN e AARESTRUP, 2011). Partindo dessa prática, vários estudos foram executados com o propósito de atestar a real eficácia do zinco na prevenção e tratamento de patologias diarreicas infecciosas em animais de produção (GLOVER et al., 2013; HEO, et al. 2010).

Heo et al (2010), verificaram os efeitos interativos do nível de proteína na dieta com suplementação de óxido de zinco (ZnO) em infecção experimental com *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) sobre a incidência de diarreia pós-desmame em leitões. Índices de fermentação de proteína foram examinados, visto que o nível de proteína na dieta promove uma fermentação no trato gastrointestinal considerada tóxica para o epitélio do cólon, causando interferência no desenvolvimento da mucosa e atrofia das vilosidades do intestino delgado, o que poderia provocar diarreia pós-desmame (HEO et al., 2010).

A atuação do zinco no estudo a supra, ainda que o mecanismo exato não tenha sido elucidado, implicaria na melhora de índices considerados importantes para um trato gastrointestinal saudável no período pós-desmame (PLUSKE et al, 2007); Tais hipóteses foram confirmadas, ao concluir que os dados obtidos demonstraram que uma dieta com baixo nível de proteína e suplementada com óxido de zinco, reduziram a ocorrência de diarreia pós-desmame sob condições de infecção ETEC (HEO, et al. 2010).

Escherichia coli patogênica é o agente mais importante na etiologia da diarreia pós-desmame (FAIRBROTHER et al., 2005) e frequentemente presume-se que o ZnO inibe diretamente a *E. coli* no intestino. Embasado nisso, Liedtke e Vahjen (2012), realizaram um estudo com estirpes bacterianas variadas isoladas de intestino de suínos, afim de identificar nível de resistência e suscetibilidade em 75 cepas bacterianas pertencentes a vários grupos Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Enterococcaceae, dentre outros.

O resultado do estudo acima demonstrou que das 75 cepas, 27 eram susceptíveis, 24 apresentarem resistência intermediária, e 24 apresentaram alta resistência ao óxido de zinco, existindo uma distribuição uniforme de comportamento de crescimento entre as estirpes testadas. Isso indica uma falta do agrupamento evidente e demonstra que a atividade antibacteriana do óxido de zinco não pode ser atribuída a grupos específicos de bactérias, e sim à espécie específicas. Porém, nesse estudo, 09 das 11 cepas do grupo Enterobacteriaceae apresentaram intermediária a alta resistência ao óxido de zinco (Broom et al., 2006;). Isto implica

que esta substância pode não ser responsável diretamente pela redução de diarreia em leitões causada por *E. Coli* (BROOM et al., 2006; VAHJEN et al., 2010; LIEDTKE E VAHJEN, 2012).

Glover e colaboradores (2013) realizaram um experimento objetivando avaliar o efeito da suplementação oral com zinco orgânico (metionina zinco) e inorgânico (óxido de zinco) como tratamento para diarreia neonatal em bezerros da raça holandesa, partindo do pressuposto que existe diferença de biodisponibilidade entre as duas formulações (WEDEKIND, HORTIN, BAKER, 1992). Foi presumido também que a formulação óxido de zinco apresentaria uma maior eficácia no tratamento de bezerro com diarreia, comparada à formulação orgânica, devido a evidência de ação local intra-luminal dada a sua fraca absorção pelo intestino. A hipótese deste estudo é que bezerros neonatais da raça holandesa com diarreia suplementados com zinco (seja orgânico ou inorgânico) apresentariam significativa redução dos dias para recuperação da diarreia, redução da mortalidade, e redução da perda de peso durante a fase clínica, comparado ao grupo controle (tratados com placebo) (GLOVER et al. 2013).

Os resultados do estudo acima, demonstraram que bezerros tratados com ZnO tiveram 1,4 vezes maior potencial de cura clínica em comparação com bezerros do grupo placebo, pois os vitelos tratados com ZnO tenderam a recuperar-se um (01) dia antes em comparação com os vitelos tratados com um placebo. Além disso, o risco para cura clínica em bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp. ou coronavírus quando tratados com ZnO, foi maior do que os bezerros tratados com placebo. Porém, os autores afirmam que os resultados desse estudo são limitados por encontrar diferenças clinicamente importantes entre os grupos de tratamento que não foram estatisticamente significativas. Apesar de tais limitações, os resultados do ensaio clínico mostraram que pode haver um impacto positivo do zinco na gestão da saúde em bezerro, quando se considera a redução do uso de drogas antimicrobianas (GLOVER et al., 2013).

Como visto, partículas de óxido de zinco (ZnO) têm sido reconhecidas como um agente antibacteriano, porém, experimentos desenvolvidos recentemente descobriram que a redução do tamanho das partículas do óxido de zinco para nanoescala, resultou na intensificação das propriedades antibacterianas (RAGHUPATHI et al., 2011; WAHAB et al., 2010). Pesquisadores como Danial e Yousef (2012) investigaram a atividade antibacteriana de suspensões contendo ZnO

em tamanhos nano e micrométricos, verificando que ambas apresentam a capacidade de inibir o crescimento de bactérias, tendo as suspensões de ZnO em tamanho nano uma eficiência claramente superior em relação às de tamanhos micro.

2.2.2 Mecanismo de ação do óxido de zinco

O óxido de zinco consiste em um dos agentes inorgânicos antimicrobianos mais seguros e extremamente estáveis em relação aos agentes antimicrobianos orgânicos. No entanto, o verdadeiro mecanismo para a inibição de micróbios ainda não é claramente compreendido (JALAI et al., 2010).

Alguns pesquisadores tentaram elucidar o mecanismo de ação do ZnO. Um dos pontos a serem considerados é o fato do ZnO ser altamente insolúvel em água, mas exibe maior solubilidade em condições ácidas. Nessa situação, o ZnO dissocia-se liberando Zn^{+2} , o qual pode exercer funções bactericidas, pois o efeito antimicrobiano dos metais pesados, geralmente, está associado a sua forma iônica, assim como ocorre com o elemento prata (Ag). Contudo, não é sabido se a própria molécula de óxido de zinco (ZnO) tem um efeito sobre o crescimento bacteriano (LIEDTKE e VAHJEN, 2012; SILVER, 1996).

Contra-pondo-se a essas colocações, Sawai et al. (1998, 2003) propuseram que a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a partir da molécula de ZnO, pode ser o fator principal da atividade antimicrobiana do óxido de zinco. Os mesmos autores afirmaram que a taxa de dissociação do óxido de zinco em água é muito baixa, logo a formação de Zn^{+2} pouco influencia no mecanismo de ação do óxido de zinco. Para confirmar esta hipótese, os mesmos pesquisadores utilizaram soluções de $ZnCl_2$ sobre *S. aureus* e *E. coli.*, em uma concentração 10 vezes maior de Zn^{+2} , em relação a quantidade desse íon obtido em soluções de ZnO. No entanto, os íons Zn^{+2} não apresentaram efeito sobre o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, sugerindo que o contato do pó de ZnO com célula bacteriana é um fator muito importante. Esse fato tornou-se mais evidente quando Amornpitoksuk (2011) observou que a atividade antibacteriana do óxido de zinco diminuiu quando dissolvido em solução ácida, devido ao aumento da taxa de dissolução do ZnO.

Apesar das controvérsias sobre seu verdadeiro mecanismo de ação, doses farmacológicas do óxido de zinco são usadas na suinocultura para combater a diarreia pós-desmame e melhorar o desempenho animal (PETTIGREW, 2006). O

princípio dessa aplicação presume que o baixo pH do estômago aumenta a solubilidade do ZnO, conseqüentemente, quantidades elevadas de ions Zn^{+2} livres podem atingir o intestino delgado, exercendo seu efeito bactericida (LIEDTKE E VAHJEN, 2012).

Outros pesquisadores afirmam que a eficácia do zinco na prevenção e tratamento da diarreia pós-desmame em leitões se concentra no fato de que o zinco diminui a permeabilidade intestinal impedindo a translocação de bactérias patogênicas através da barreira intestinal (ZHANG e GUO, 2009).

2.2.3 Resistência microbiana ao óxido de zinco

Impulsionado pelo surgimento de cepas multi-resistentes da família *Enterobacteriaceae* (EWERS et al., 2012) na produção animal, em anos recentes, o uso de promotores de crescimento antimicrobianos como aditivos na alimentação animal foi banido na União Européia, desde 2006. (BEDNORZ, 2013). Várias alternativas têm sido consideradas para promover o crescimento e reduzir a carga do agentes patogênicos na criação de animais, visto que é necessária essa prática na pecuária intensiva.

A utilização do óxido de zinco como aditivo consiste em alternativa ao uso de antimicrobianos tradicionais na alimentação animal (HEO e OPAPEJU, 2012). Existindo a hipótese de que o zinco pode ter um efeito direto sobre a diversidade e resistência de *Escherichia coli* no intestino de animais, Bednorz e outros pesquisadores (2013) validaram essas afirmações ao observarem uma maior diversidade em clones de *E. coli* de suínos suplementados com zinco, quando comparado ao grupo controle. Além de ser verificada que uma proporção de *E. coli* multi-resistentes nos suínos suplementados com zinco (18,6%) foi significativamente maior em relação ao grupo controle (0%) (BEDNORZ, 2013).

O mecanismo de bomba de efluxo é importante para a resistência de zinco, envolvendo diferentes moléculas transportadoras (GRASS et al., 2002). Uma delas é a ATP-tipo ATPases que abrangem a membrana interna da célula procariota e utiliza ATP para bombear íons metálicos a partir do citoplasma para o periplasma. Este é o caso da ZntA, uma ATPase de metal-translocação da *Escherichia coli*, que confere resistência ao chumbo, cádmio e Zinco (SHARMA et al., 2000). Existe também ZitB, um protótipo transportador da família cátion difusão facilitador (CDF),

que também foi descrito em *E. coli*, é considerado como trocador quimiosmótico de íon-próton (GRASS et al. 2002).

Cavaco, Hasman e Aarestrup (2011) avaliaram a prevalência da resistência ao zinco em isolados de MRSA CC398, obtidos de suínos e bezerros oriundos de países europeus. O Complexo Clonal 398 é mais frequentemente associado às cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) de animais de produção (CUI et al., 2009; BATTISTI et al., 2009). Nesse trabalho, também foi avaliado o papel do gene *czrC* que confere resistência ao zinco e cádmio em *Staphylococcus aureus* (CAVACO et al., 2010). A resistência fenotípica ao zinco (MIC > 2 mM) foi observada em 74% e em 42% dos MRSA CC398 europeus de suínos e bezerros, respectivamente. Os resultados da PCR apresentaram uma significativa correlação com os resultados obtidos no teste fenotípico, uma vez que 95% dos isolados de suínos e 97% dos isolados de bezerros resistentes ao zinco, transportavam o gene *czrC*.

Os resultados do experimento acima presume que efeito seletivo do zinco pode ter impacto sobre a microbiota dos animais de produção, proporcionando uma vantagem competitiva às cepas resistentes. Por isso, a aplicação de compostos de zinco na produção animal deve ser um fator importante a considerar no futuro, quando analisar a dinâmica de seleção dos MRSA (CAVACO, HASMAN e AARESTRUP, 2011).

2.2.4 Toxicidade

As diversas formas de zinco têm diferentes toxicidades. O sais de zinco tem uma dose letal média (DL 50) de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Óxidos de zinco são menos tóxicos, sendo frequentemente encontrados em pomadas, que quando aplicadas topicamente em cães, pode ocorrer a ingestão do óxido de zinco por lambedura. Estimou-se que a dose tóxica é de aproximadamente 108g de zinco no cão (VETERINARY TOXICOLOGY, 2007).

Exposição ao óxido de zinco pode ocorrer por inalação, ingestão e contato com a pele e olhos. A ingestão de pomadas de óxido de zinco é mais comum em ambientes domésticos, sendo geralmente considerada não tóxicas devido concentrações relativamente baixas do produto. A inalação de partículas de óxido de zinco em áreas industriais pode levar a riscos potencialmente tóxicos. Entretanto, o óxido de zinco não é absorvido numa quantidade significativa quando aplicado à

pele intacta. A inalação pode resultar na absorção sistêmica mínima (GRACIA, 2005).

2.3 Nitrato de prata

Os primeiros metais a serem manipulados e utilizados pelo homem foram aqueles que podiam ser encontrados na natureza como elemento puro. A prata foi um deles. Existe um consenso entre os pesquisadores a respeito da descoberta desse precioso metal, acredita-se que a prata tenha sido o terceiro metal a ser encontrado e manipulado pelo homem, sendo sua descoberta antecedida pela do ouro e do cobre (KING, 1994).

Os alquimistas consideravam a prata como o elemento mais próximo do ouro. Para eles o ouro era um metal perfeito e por isso deram-lhe o símbolo de um círculo, representando o sol, e para a prata, “quase perfeita”, atribuíram-lhe o símbolo de um semicírculo, representando a lua. O nome dado a esse metal deveu-se ao seu brilho característico, a palavra prata tanto em grego (*argyros*) quanto em latim (*argentum*) significa brilhante. O símbolo químico dado à prata (Ag) deve-se ao seu nome em latim (SOUZA et al., 2013).

A prata localiza-se no bloco *d* da Tabela Periódica (metal de transição), grupo 11, período 5 (Souza et al, 2013). Quando combinada com os outros elementos do quadro periódico, a prata exhibe essencialmente o estado de oxidação +1 (AgCl), exceto em AgF₂, cujo estado de oxidação é Ag⁺² (LEE, 2000).

O emprego da prata e de seus compostos na medicina e na purificação da água se deve à atividade antibacteriana e antifúngica dos íons Ag⁺, que podem ser liberados a partir de vários compostos como, prata metálica, sais inorgânicos, complexo de prata (SOUZA et al., 2013), prata coloidal e nanopartículas de prata (PANYALA et al, 2008).

Prata metálica se refere ao estado elementar da prata – Ag⁰ e se dissolve em ácidos e sais, cujo princípio é utilizado para a produção de nitrato de prata. O estado metálico da prata é considerado inerte ou pouco reativo às células microbianas (TROP, NOVAK e RODL, 2006).

A prata coloidal é uma solução contendo prata com 1 nanômetro a 1 micrômetro ou partículas de prata. O termo "coloidal" foi cunhado pelo químico Inglês Thomas Graham (em 1800), que mais tarde foi chamado "Pai da química coloidal". A prata coloidal pode apresentar-se sob a forma metálica super-fina ou sob

a forma de compostos insolúveis de prata, finalmente dispersa em solução que mostra pequena ou elevada turvação (PANYALA et al, 2008).

O termo nano-prata refere-se ao tamanho nanoparticulado das partículas de prata, em torno de 5-50 nanômetro. A maior parte da prata está na metálica e o restante sob a forma iônica. Devido ao reduzido tamanho das partículas, a área superficial total exposta da prata é maximizada, o que resulta em um possível maior efeito por unidade de prata (ALT et al., 2004).

Todos os sais de prata são insolúveis, com exceção do AgNO_3 (nitrato de prata), AgF (fluoreto de prata) e AgClO_4 (perclorato de prata) (LEE, 2000). Os sais de prata foram utilizados ao longo do tempo como agentes antimicrobianos, tais como cloreto de prata (AgCl), nitrato de prata (AgNO_3) e sulfato de prata (AgSO_4), estes sais representam sistemas de liberação mais estáveis, pois o íon de prata de carga positiva (Ag^+) se liga a íons carregados negativamente (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) (ATIEH, 2007).

O nitrato de prata é um sal inorgânico, sólido à temperatura ambiente, de coloração esbranquiçada e sensível à luz. É bastante solúvel em água, formando soluções incolores (LEE, 2000). Deve-se considerar que a solução de nitrato de prata é instável. Sua concentração aumenta pela evaporação e se modifica pela ação da luz, originando uma solução fortemente cáustica. O calor dissocia suas moléculas, formando radicais livres. Daí, a necessidade de armazená-la durante o tempo correto e em condições adequadas (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1985).

Os relatórios atuais suportam que o uso de íons de prata ou da prata metálica, podem ser explorados pela indústria fotográfica, na produção de energia (como no caso das baterias secas), na fabricação de espelhos, em amálgama dentário, em fármacos, na purificação da água, dentre outras aplicações (SOUZA, et al., 2013).

Na medicina, a prata vem sendo aplicada no tratamento de queimaduras, revestimento de materiais de aço inoxidável, tecidos têxteis hospitalares, cremes, protetores solares, etc (DURAN et al., 2007).

Apesar de aplicações diversas dos compostos de prata, em vários segmentos, esta revisão visa abordar a utilização dos mesmos na medicina humana e animal, dando ênfase ao seu poder antimicrobiano.

2.3.1 Uso terapêutico dos compostos de prata

Ao longo da história, a prata, apresentada sobre diversos compostos (prata elementar, prata iônica, prata coloidal, complexos de prata e nanopartícula de prata), foi utilizada em várias finalidades em terapias humanas e, mais recentemente, em animais.

O nitrato de prata era usado em sua forma sólida, sendo conhecido por outros termos como "Caústico Lunar", nome sugerido por Paracelsus" devido a semelhança entre a prata com a lua. Em 1700, esse composto foi utilizado para o tratamento de doenças venéreas, fístulas das glândulas salivares, e abscesso perianal (KLASEN, 2000; LANDSDOWN, 2002).

Em aplicações de outrora, sem a precisa indicação do ano, o nitrato de prata foi utilizado em tratamento oral através de solução a 0,2-1,0% ou ingestão de comprimido contendo 10 mg, com a finalidade de tratar doenças do sistema nervoso e epilepsia. Protocolo terapêutico que posteriormente, foi considerado inadequado ou mesmo nocivo à saúde (PIMENTEL et al., 2006).

No século XIX, compostos de prata foram introduzidos em alguns protocolos terapêuticos, a considerar o tratamento para o tétano e reumatismo, no ano 1800 (RUSSEL, 1994), como também, em 1881, colírios de nitrato de prata foram utilizados em tratamentos de oftalmia neonatal, denominado Método de Credé, com uma inquestionável importância na prevenção da conjuntivite neonatal e da cegueira, na Europa e em todo o mundo (KLASEN, 2000; LANDSDOWN, 2002; PASSOS E AGOSTINI, 2011).

Ainda hoje, em alguns países é determinada por lei a necessidade de instilar nos olhos de crianças recém-nascidas soluções aquosas contendo sais de prata para evitar infecções oculares neonatais (SILVER, 2003). Até o final do século XX, o método de Credé foi o de escolha para a profilaxia de conjuntivite neonatal em todo o Brasil (PAGLIUCA et al., 1977), tendo sido ainda recomendado na edição de 2006 do Manual DST /AIDS do Ministério da Saúde. O Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2012) regulamenta a formulação da solução oftálmica de nitrato de prata à 1% para seu emprego na prevenção da oftalmia gonocócica neonatal.

Ainda no século 19, tecidos de granulação foram removidos com nitrato de prata para permitir epitelização e promover a formação de crosta na superfície de

feridas. Ao mesmo tempo, variando as concentrações de nitrato de prata, este composto passou a ser utilizado para tratar queimaduras (CASTELLANO et al., 2007; KLASSEN, 2000).

No início de 1900, a prata foi usada para tratar infecções do trato respiratório superior e gonorreia, mas seu uso foi desfavorecido após o advento dos antibióticos em 1920 (FUN-REN E FAN ALLEN, 2002; MIRSATTARI, HAMMOND e SHARPE 2004). Chopra (2007) afirma que na década de 1940, após a descoberta da penicilina, a utilização da prata para o tratamento de infecções bacterianas foi minimizada.

Na década de 1960, a prata reascendeu como princípio antimicrobiano quando Moyer a reintroduziu, sob a forma de nitrato de prata a 0,5%, no tratamento de queimaduras. Ele propôs que esta solução não interfere na proliferação epidérmica e possui propriedade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Moyer et al, 1965).

Em 1968, o nitrato de prata foi combinado com a sulfonamida para formar o creme sulfadiazina de prata, formulação que apresentou um largo espectro antibacteriano que também passou ser usado para o tratamento de queimaduras. A sulfadiazina de prata é considerada eficaz contra bactérias como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* sp. e apresenta atividades antifúngica e antiviral (FOX e MODAK, 1974).

Atualmente, a sulfadiazina de prata é muito utilizada em pacientes humanos com queimaduras, feridas abertas e úlceras crônicas a fim de se evitar e tratar infecções bacterianas (SILVER, 2003; SOUZA et al., 2013). Neste sentido, o elemento prata é útil como agente profilático ou agente terapêutico para a prevenção de colonização por microrganismos que impedem o processo de cicatrização dos ferimentos (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007).

Atiyeh, Costagliola e Hayek (2007) afirmaram que a prata também exerce efeito inibitório em determinadas citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa. No entanto, nem toda prata é anti-inflamatória, sendo considerados fatores como propriedades do veículo de entrega e a concentração do elemento.

Ainda sobre aplicação terapêutica da prata, nos dias atuais, o nitrato de prata é utilizado na forma de bastão para uso externo na remoção de verrugas (PIMENTEL et al., 2006). Formulado em soluções à 1%, o nitrato de prata é

empregado, considerando seu efeito adstringente, antisséptico e cáustico, no tratamento de herpes simples e genital (ANVISA, 2012).

A aplicação tópica de nitrato de prata, duas a três vezes por semana, nas primeiras semanas de vida de bebês, é o tratamento preconizado para granulomas umbilicais de recém-nascidos, com a finalidade de reduzir o risco de infecção umbilical (BRODSGAARD et al., 2015).

Em um ensaio utilizando nitrato de prata na cauterização de estomatite aftosa em humanos, foi demonstrado que esse sal inorgânico parece ser uma eficaz opção de tratamento para alívio da dor, além de reduzir o tempo de cicatrização das úlceras (ÖZLER, 2014).

Existem relatos da aplicação terapêutica do composto nitrato de prata em casos clínicos humanos de pleurodese, com o intuito de provocar inflamação eliminando o espaço entre as pleuras, além da efetiva contribuição do seu efeito antisséptico. Os experimentos liderados pelo pneumologista Francisco Vargas demonstraram a eficácia e a segurança da solução de nitrato de prata para o tratamento de derrames pleurais em concentrações de apenas 0,5%, concentração 20 vezes menor que as utilizadas há 20 anos atrás (ZORZETTO, 2004).

O nitrato de prata mostrou-se como um agente simples, barato, seguro e potencialmente eficaz para ablação endometrial em mulheres portadoras de menorragia, ainda que seja necessário o desenvolvimento de um método adequado para aplicação do nitrato de prata (NEUWIRTH e SINGER, 2013).

Outra importante aplicação de compostos de prata na medicina é no revestimento de cateteres, válvulas cardíacas e outros dispositivos médicos com polímeros empregados de prata a fim de retardar o desenvolvimento de biofilme microbiano (SILVER, 2003).

Como visto, a maioria das informações sobre aplicações terapêuticas dos compostos de prata é obtida a partir da literatura da medicina humana. Contudo, ainda é possível verificar alguns registros terapêuticos com prata na medicina veterinária. A começar com Spinosa et al. (2006), afirmando que as principais preparações e especialidades contendo derivados de prata são nitrato de prata, sulfadiazina de prata e vitelinato de prata, os quais apresentam efeitos bacteriostáticos, bactericidas e adstringentes.

Da mesma forma que na medicina humana, a solução de nitrato de prata é tratada como útil na profilaxia neonatal e em queimaduras extensas. Ainda em

solução, à 0,25%, o nitrato de prata é também indicado como adstringente, antisséptico e coagulante. Pode ser aplicado de forma frugal, embora frequentemente. Já na sua fórmula sólida, o nitrato de prata é indicado para remoção de tecido de granulação e verrugas, e na cauterização de ferimentos. Como vantagem do uso de nitrato de prata, suas soluções apresentam-se altamente germicida (SPINOSA et al., 2006).

Por fim, o benefício médico da prata, geralmente, está atribuído à sua capacidade antimicrobiana sendo documentada como agente de largo espectro abrangendo fungos e bactérias, além de incluir espécies resistentes, tais como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococos* resistentes à vancomicina (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007). Outras bactérias já foram citadas como sensíveis à prata, a exemplo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii* (MARGARET et al., 2006), *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus flexneri*, e *Staphylococcus typhimurium* (SARKAR et al., 2007).

2.3.2 Emprego de compostos de prata como antimicrobiano

O uso da prata em tratamentos antimicrobianos tem sido relatado em toda a história. Existem relatos que em 1000 a.C., a prata já era implementada no processo de obtenção de água potável (RICHARD et al., 2002). De fato, o uso de compostos de prata como medicamento é muito antigo e vale destacar que seus sais, como exemplo, o nitrato de prata (AgNO_3), tem sido utilizados durante séculos como agentes antimicrobianos e que o uso destes, diminuiu drasticamente quando os antibióticos foram introduzidos nas práticas médicas (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007).

De modo geral, o emprego da prata e de seus compostos na medicina se deve à atividade antimicrobiana dos íons Ag^+ . Para isso, a prata elementar requer ionização em prol de uma eficaz atividade antimicrobiana, pois a prata elementar (ou prata metálica) é tida como relativamente inerte sendo fracamente absorvida por mamíferos e células bacterianas (TROP, NOVAK e RODL, 2006; WRIGHT, LAM e BURRELL, 1998).

Recentemente, devido ao aparecimento de bactérias resistentes e as limitações do uso de antibióticos, os médicos voltaram a utilizar curativos contendo

níveis variáveis de prata, com o objetivo de evitar a colonização de bactérias que impedem o processo de cura dos ferimentos (CHOPRA, 2007).

Lipsky e Hoey (2009) consideram que propriedades como uma rápida atividade bactericida; poder residual no local aplicado; alta atividade em presença de fluidos corporais; uma baixa probabilidade de indução de resistência bacteriana; são critérios importantes para um agente antimicrobiano tópico, e acrescentam que a prata apresenta muitas dessas propriedades, devendo ser considerada na eleição de fármacos para o tratamento de feridas ou lesões humanas.

A maioria das informações disponíveis sobre a utilidade de prata como um agente antimicrobiano é derivada da literatura médica humana, especialmente em relatórios publicados a respeito de lesões térmicas. No entanto, mais informações continuam a ser divulgadas a partir de estudos científicos que validam o uso específico de compostos de prata na medicina veterinária. Neste segmento, a prata tem sido muito utilizada para administração tópica em equinos e animais de produção, com a sua utilização estendendo-se até em animais de companhia e espécies exóticas laboratoriais (McREE, 2015).

Na farmacologia veterinária, a sulfadiazina de prata é o composto de eleição para o tratamento de queimaduras, quando comparado ao uso do nitrato de prata para esta mesma finalidade (SPINOSA et al., 2006). Atualmente sprays dermatológicos veterinários contendo sulfadiazina de prata, somado a outros componentes não antissépticos, são utilizados rotineiramente na produção animal a fim de promover condição asséptica em ferimentos, descornas, cirurgias em geral e cicatrização de umbigos de animais recém-nascidos (ITV, 2010).

Existem no mercado farmacêutico veterinário, produtos à base de prata coloidal, também chamada de colargol, com indicação para algumas espécies domésticas (bovinos, equinos, ovinos, caprinos, suínos, cães e gatos) no tratamento de diarreias de origem infecciosas. Na bula destes medicamentos, são garantidas como propriedades uma poderosa ação bacteriostática, além de promover, quando injetado, uma intensa leucocitose, aumentando a resistência orgânica do animal contra os processos infecciosos. O fabricante afirma que o colargol exerce uma ação oxidativa sobre as toxinas bacterianas, reduzindo-as a substâncias inócuas ao organismo do animal (ITV, 2010). O Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2012) traz o colargol como sinonímia do vitelinato de prata, o qual é indicado como solução tópica nasal antisséptica e solução oftálmica

2.3.3 Mecanismo de ação da prata

A propriedade antimicrobiana da prata está relacionada com seu estado químico elementar ou metálico (Ag^0) e iônico (Ag^+), como também com a sua quantidade e sua taxa de liberação. A prata em seu estado metálico é inerte, fracamente absorvida por células bacterianas (TROP, NOVAK e RODL, 2006). Por isso, requer ionização para exercer atividade antimicrobiana efetiva (CASTELLANO et al. 2007; LANSDOWN, 2002).

O mecanismo exato de ação de prata sobre os micro-organismos ainda não está plenamente elucidado, mas vem sendo sugerido com base nas alterações morfológicas e estruturais verificadas nas células bacterianas (RAI, YADAV e GADE, 2009).

Segundo Castellano et. al. (2007), a prata altamente ionizada é reativa, uma vez que se liga a proteínas teciduais e promove mudanças estruturais na parede celular bacteriana e na membrana citoplasmática da célula, levando à distorção e à morte. Os autores acrescentam que a prata também se liga ao DNA e RNA bacteriano exercendo desnaturação e inibindo a replicação bacteriana (CASTELLANO et al., 2007; LANSDOWN, 2002). Em concordância com estas afirmações, outros pesquisadores enfatizaram que a prata interage com proteínas estruturais e associa-se preferencialmente com bases de DNA inibindo sua síntese. (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007; RICHARD, SPENCER e MCCOY, 2002; RUSSEL, 1994).

Franco e Gonçalves (2008) também validam o mecanismo dos íons de prata que causam a precipitação de proteínas e agem diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana, exercendo ação bactericida imediata e ação bacteriostática residual.

Diferente do exposto acima, Fox e Stanford (1971) mencionaram que a prata é tóxica para os microrganismos por comprometer enzimas respiratórias como a fosfomanose isomerase, bem como prejudicando algumas funções do DNA bacteriano. Seguindo a mesma linha, Percival, Bowler, e Russell (2005) afirmam que a ação inibidora da prata decorre, em parte, da sua acumulação dentro do organismo bacteriano e de uma forte interação com grupos tiol presentes em enzimas respiratórias das células bacterianas.

2.3.4 Sistemas de entrega da prata

Sabendo-se que a propriedade antimicrobiana da prata está relacionada com seu estado químico e com sua taxa de liberação (TROP, NOVAK e RODL, 2006), a análise dos sistemas de entrega da prata se faz necessária para manutenção da atividade antimicrobiana em formulações terapêuticas.

Houve numerosos novos sistemas de entrega e formulações desenvolvidas para o uso terapêutico da prata no século passado. Soluções de prata coloidal (eletricamente carregadas) foi o sistema de entrega mais comum antes de 1960. Essas soluções consistiam de partículas carregadas de prata pura (3 a 5 ppm), mantida em suspensão por pequenas correntes elétricas. Estes íons positivos repelem e, assim, permanecem na solução, mesmo quando aplicado topicamente a uma ferida (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007).

As proteínas de prata (complexo de prata com pequenas proteínas para melhorar estabilidade em solução) foram desenvolvidas para tratar ferimentos humanos, mas devido a uma significativa redução da ação antimicrobiana sua utilização foi substituída pelo uso da prata isolada (TROP, NOVAK e RODL, 2006).

Os sais de prata, tais como cloreto de prata (AgCl), nitrato de prata (AgNO_3) e sulfato de prata (AgSO_4) representam sistemas de liberação mais estáveis, pois o íon de prata de carga positiva (Ag^+) se liga a íons carregados negativamente (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}). O nitrato de prata, a 0,5% de concentração, é o sal mais utilizado topicamente em queimaduras. No entanto, o nitrato de prata apresenta algumas limitações nessa condição de uso, pelo fato de ser considerado citotóxico, se a concentração for superior a 1% (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007).

Outro ponto limitante a considerar na administração tópica do nitrato de prata é o fato de que uma grande concentração de íons de prata é liberada após sua aplicação, sendo rapidamente inativado pela ligação de íons Ag^+ com íons Cl^- e com proteínas, resultantes dos exsudatos das células, necessitando de reaplicações frequentes (CHO LEE, LEEM e LEE, 2005; MOONEY, 2006; POON e BURD, 2004).

Foi observado que compostos providos de grupo tiol biologicamente relevantes, tais como GSH (glutathiona reduzida) e cisteína, outros componentes do sangue, reduzem significadamente a toxicidade dos íons de prata para bactérias clinicamente importantes, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MULLEY, JENKINS E WATERFIELD, 2014).

2.3.5 Resistência bacteriana à prata

Um dos grandes legados atribuídos à prata como antimicrobiano é a rara resistência microbiana, porém, não desconhecida (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007). Woods, Cochrane e Percival (2009) apontaram que a resistência à prata tem sido relatada em bactérias isoladas tanto clínica quanto ambiental em vários estudos conduzidos a partir de 1975. Nesse mesmo ano, a base genética para a resistência microbiana à prata foi relatada pela primeira vez por McHugh et al. (1975), ao demonstrarem que a resistência a prata seria codificada por um plasmídeo denominado pMG101, tal suposição tem sido confirmada por outros pesquisadores (DAVIS, RICHARDS e MULLANY, 2005; GREWAL e TIWARI, 1990; GUPTA, MAYNES e SILVER, 1998).

O grupo de genes que confere resistência à prata – *sil* genes, codificam a expressão de duas bombas de efluxo de prata (uma ATPase e outra quimiosmótica) e duas proteínas periplasmáticas de ligação ao Ag⁺ (SILVER, 2003). Outros autores também documentaram que a forma de resistência à prata pode estar limitada a uma forma de complexo intracelular utilizando sistemas de efluxo celulares. (RICHARD, SPENCER e MCCOY, 2002; RUSSEL e HUGO, 1994).

Baseado no fato de que, atualmente, compostos de prata vem sendo utilizados em tratamento de queimaduras, feridas abertas, e úlceras crônicas, tanto em humanos quanto em animais, Woods, Cochrane e Percival, em 2009, conduziram um ensaio experimental a fim de determinar a prevalência de genes *sil* de resistência à prata dos isolados oriundos de ferimentos de humanos e de equinos, e verificar o grau de resistência fenotípica destes isolados, através da análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

No estudo apresentado a supra, 172 estirpes de bactérias foram utilizadas, das quais 60 eram oriundas de ferimentos de equinos, que incluíam diversas espécies de bactérias, *Bacillus cereus*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus avium*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterobacter cloacae*, dentre outras. Os demais isolados bacterianos obtidos de ferimentos de humanos, em número de 112, compreenderam espécies como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*, dentre outras. Como resultado, das 172 bactérias isoladas de feridas crônicas em seres humanos e cavalos, 6 foram positivas para os genes

Sil na técnica de PCR, sendo 02 isolados de humanos e 04 de equinos. Todos os isolados positivos para o genes de resistência a prata pertenciam a espécie *Enterobacter cloacae*, e tais genes foram rastreados em plasmídeos. Nos resultados da CIM para o nitrato de prata, foi demonstrado que cepas com genes do grupo *sil* obteve valor de CIM maiores que 5 mg/L, enquanto que cepas *sil* negativas obtiveram valores em tornos de 1-2,5 mg/L.

Os dados do estudo de Woods, Cochrane e Percival (2009) mostraram que 3,5% de um total de 172 bactérias isoladas possuem genes de resistência à prata. Os valores de CIM mostraram que o as concentrações inibitórias de nitrato de prata foram apenas marginalmente superior em *sil*-positivo em comparação com estirpes *sil*-negativo. Contudo, os autores ainda concluíram que os isolados do estudo exibiram baixo nível de resistência fenotípica à prata e acrescentaram que a presença do grupo de genes *sil* não é o suficiente para oferecer proteção completa contra a atividade antimicrobiana do Ag^+ .

Em um estudo sobre a resistência de prata em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, que continham o gene *silE*, isolado de cães, cangurus, cavalos e chimpanzés. Todos estes isolados apresentavam o gene de resistência a prata e apresentaram sensibilidade, em ensaios *in vitro*, a um impregnado de prata, fornecendo evidências de que as propriedades antimicrobianas de prata podem ser utilizadas efetivamente (LOH, PERCIVAL e WOODS, 2009).

2.3.6 Toxicidade da prata

Tratando-se da toxicidade da prata, são encontradas diversas contradições. Para Silver (2003), a administração de íons de prata (Ag^+) como medicamento é vantajosa, pois esses íons, geralmente, não apresentam efeitos adversos em seres humanos. Em concordância com esta afirmação, Duran et al. (2007) ratificaram que os compostos de prata podem ser utilizados na medicina, tendo em vista sua baixa toxicidade para as células humanas, alta estabilidade térmica e baixa volatilidade.

Em contrapartida, são encontrados alguns registros que desfavorecem o uso de compostos de prata na medicina. A começar pela citação de Atieh (2007) enfatizando os efeitos secundários adversos associados ao uso da prata em humanos, compreendendo desequilíbrio eletrolítico e desconforto em pacientes. Estas questões históricas de tratamento têm sido abordadas como um problema na elaboração de novos produtos tópicos para feridas.

É sabido também que as soluções de prata são instáveis e produzem manchas na pele tratada, com preto típico, quando expostos à luz. Além disso, a redução de nitrato a nitrito causa lesão celular induzida por oxidantes, o que é a causa mais provável da re-epitelização prejudicada em relatos do seu uso em queimaduras (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007).

Estudos sugerem que a prata atrasa o processo de cicatrização, podendo ter atividade citotóxica grave em várias células hospedeiras. Independentemente da fonte, se liberada de soluções, cremes, pomadas ou pensos impregnados, a prata demonstrou ser tóxica, em ensaios *in vitro*, para queratinócitos e fibroblastos (CHO LEE, LEEM e LEE, 2005; POON e BURD, 2004).

Segundo Gong et al. (2007) compostos de prata usados como droga desinfetante apresenta alguns riscos como a exposição a prata que pode causar argirose, condição clínica de intoxicação por prata em que a pele adquire uma cor cinzenta-azulada por acumulação do metal nos tecidos.

O nitrato de prata é considerado cáustico e irritante para pele e mucosas. Sua ingestão pode causar gastroenterite séria, que pode evoluir para óbito (THE INDEX MERCK, 2001). A prata inalada pode ser absorvida pelos pulmões, já a absorção dérmica de prata é improvável (FURST e RADDING, 1998). O nitrato de prata também é considerado tóxico para organismos aquáticos (THE INDEX MERCK, 2001).

A toxicidade aguda de prata metálica e da prata solúvel em água é moderada. A dose letal a 50 por cento (DL50) oral em ratos para prata coloidal foi de 100 mg/kg, e relativamente semelhante para os compostos solúveis em água, nitrato de prata de 50-129 mg/kg, e cianeto de prata com DL50 de 125 mg/kg. O nitrato de prata parece muito menos tóxico em coelhos, por via oral, com DL50 de 800 mg/kg (FURST e RADDING, 1998). Foi documentada também, uma DL50 = 1173 mg/kg para ratos, via oral (THE MERCK CHEMICAL DATABASE, 2005).

3. REFERÊNCIAS

AKIYAMA, H.; et al. **Effect of zinc oxide on the attachment of *Staphylococcus aureus***. Journal of Dermatological Science, v.17, p. 67– 74, 1998.

ALT, V.; BECHERT, T.; STEINRUCKE, P.; WAGENER, M.; SEIDEL, P.; DINGELDEIN, E.; DOMANN, E.; SCHNETTLER, R. **An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement**. Biomaterials, 25: p. 4383-4391, 2004.

ALVES, A. P. P. **Avaliação da atividade *in vitro* de óxidos de zinco e de titânio sobre bactérias do gênero *staphylococcus* spp. isolados de casos de mastites caprina e bovina**. 2013. 37 f. Trabalho de conclusão de curso em medicina veterinária - UNIVASF, Petrolina-PE, 2013.

AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZOÍN, M.; LEIVA, J.; OTEIZA, C.; PE´REZ, M.; ALABART, J.L.; HERNÁNDEZ-YAGO, J. **Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro**. Journal Antimicrobial Chemotherapy. p. 43–55, 1999.

AMORNPITOKSUK, P.; et al. **Synthesis, photocatalytic and antibacterial activities of ZnO particles modified by diblock copolymer**. Powder technology, p. 432-438, 2011.

ANDRADE, U. V. C. de. **Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras**. 2010. 85 f. Tese (Doutorado em alimentos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR.

ANTUNES, A. L. S. et al. **Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por Agar Congo Red**. Revista de Saúde da UCPEL, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 27-31, 2007.

ANVISA (Brasil). **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. Brasília, 2.ed. 2012.

ATIYEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK S.N. **Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature**. Burns, 33:139-148, 2007.

ATULYA, M.; MATHEW, A. J.; RAO, J. V.; RAO, M. **Influence of milk components in establishing biofilm mediated bacterial mastitis infections in cattle: A fractional factorial approach.** Research in Veterinary Science, 96, p.25–27, 2014.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. **Review:** Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology, v. 61, p. 1-10, 2000.

BALLOU, M. A. **Growth and development symposium: inflammation: role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows.** Journal Animal Science, 90, p.1466–1478. 2012.

BATISTUZZO, J. A. O. **Formulário médico farmacêutico.** 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

BATTISTI, A.; FRANCO, A.; Merialdi, G.; HASMAN, H.; IURESCIA, M.; LORENZETTI, R.; FELTRIN, F.; ZINI, M.; AARESTRUP, F.M. **Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings.** Veterinary Microbiology., 142, p. 361–366, 2009.

BEAUDEAU, F. et al. **Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts.** Preventive Veterinary Medicine, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 43-54, 2002.

BEDNORZ, C.; OELGESCHLÄGERA, K.; KINNEMANNA, B; HARTMANNB, S.; NEUMANNK, K.; PIEPERD, R.; BETHEA, A.; SEMMLERA, T.; TEDINA, K.; SCHIERACKE, P.; WIELERA, L. H.; GUENTHERA, S. **The broader context of antibiotic resistance:** zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. International Journal of Medical Microbiology, 303, 396– 403, 2013.

BHASME, P. C.; MAHANTESH, M. K.; RAJESHWARI, D. S.; ROHIT, B. K.; BASAPPA, B. K. **In silico characterization of putative drug targets in *Staphylococcus saprophyticus*, causing bovine mastitis.** Bioinformation 9, p. 339–344, 2013.

BRITO, M. A. V. P; Brito, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. **Concentração mínima inibitória de dez antimicrobiano para amostra de *Staphylococcus aureus* isolados de infecção intramamária bovina.** Arquivos Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia, Juiz de Fora, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

BRODSGAARD, A.; NIELSEN, T.; MOLGAARD, U.; PRYDS, O.; PEDERSEN, P. **Treating umbilical granuloma with topical clobetasol propionate cream at home is as effective as treating it with topical silver nitrate in the clinic.** *Foundation Acta Paediatrica*, p. 174–177, 2015.

BROOM, L.J.; MILLER, H.M.; KERR, K.G.; KNAPP, J.S. **Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets.** *Research in Veterinary Science.*, 80, p.45–54, 2006.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; Mansur, J.R.G.; Thomaz, L.W. et al. **Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no estado de Goiás.** *Ciência rural*, Santa Maria, v.35, n.4, p.848-854, 2005.

CARDOZO, V. F. et al. **Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis.** *International Journal of Pharmaceutics*, 473, p.20–29, 2014.

CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILLIPS, I. **The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health.** *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 52, p.159–161, 2003.

CASTELLANO, J.J.; SHAFII, S.M.; KO, F.; DONATE, G.; WRIGHT, T.E.; MANNARI, R.J. **Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs.** *International Wound Journal*, 4(2):114–22, 2007.

CAVACO, L.M.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F.M. **Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance.** *Veterinary Microbiology*, 150. p. 344–348, 2011.

CAVACO, L.M.; HASMAN, H.; STEGGER, M.; ANDERSEN, P.S.; SKOV, R.; FLUIT, A.C.; ITO, T.; AARESTRUP, F.M. **Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 54, p.3605–3608, 2010.

CHO LEE, A. R.; LEEM, H.; LEE, J. **Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor.** *Biomaterials*, 26:4670-4676, 2005.

CHOPRA, I. **The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?** *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 59:587–90, 2007.

CONTRERAS A.; SIERRA, D.; ANCHEZ, A.S.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. **Mastitis in small ruminants**. *Small Ruminant Research*, p.145-153, 2007.

CORRÊA, I.; CORRÊA, M. G. P.; MARIN, J. M. **Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk**. *Ars Veterinaria, Jaboticabal*, v. 21, n. 1, p. 69-76, 2005.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. **Mastite bovina, controle e prevenção**. *UFLA, Boletim Técnico UFLA, Lavras-MG*, n. 93, p. 1-30, 2012.

COSTA, E. O. et al. **Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos causados de prevenção em propriedades leiteiras**. *Napgama, São Paulo*, n.2, p.16-20, 1999.

CUI, S., LI, J., HU, C.; JIN, S., LI, F., GUO, Y., RAN, L., MA, Y. **Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China**. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 680–683, 2009.

DANIAL. E. N.; YOUSEF, J. M. **In Vitro Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Zinc Oxide and Nano-particle Zinc oxide Against Pathogenic Strains**. *Journal of Health Sciences*, v.2, p.38-42, 2012.

DANTAS, G.; SOMMER, M.O.A.; OLUWASEGUN, R.D.; CHURCH, G.M. **Bacteria subsisting on antibiotics**. *Science*, 320, p. 100–103, 2008.

DAVIS, I. J.; RICHARDS, H.; MULLANY, P. **Isolation of silver and antibiotic resistant *Enterobacter cloacae* from teeth**. *Oral Microbiology Immunology*., 20 (3), p. 191–194, 2005.

DURAN, N.; MARCARTO, P.D.; DE SOUZA, G.I.H.; ALVES, O.L.; ESPOSITO, E. **Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment**. *Journal Biomedical Nanotechnology*, 3:203–8, 2007.

EWERS, C.; BETHE, A.; SEMMLER, T.; GUENTHER, S.; WIELER, L.H. **Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective.** Clinical Microbiology and Infection., 18, p. 646–655, 2012.

FACCIN, A. **Atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* de *Schinus terebinthifolius* Raddi no controle da mastite bovina.** 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas-RS.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. **Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações na saúde pública.** Ciência rural, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, E.; GYLES, C.L. ***Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs; an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies.** Animal Health Research Reviews, 6, p.17–39, 2005.

FELTRIN, C. W. **Síntese e propriedades do ZnO: correlação entre propriedades estruturais e atividade fotocatalítica.** 2010. 66f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Estratégias de controle para mastite e melhoria na qualidade do leite.** Barueri: Manole, 2007.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite.** São Paulo: Lemos, 2001. 175p.

FOX, C. L.; MODAK, S. M. **Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, 5 (6):582–8, 1974.

FOX, C. L.; STANFORD, J. W. **Anti-bacterial action of silver sulphadiazine and DNA binding.** Research in Burns, p. 133-138, 1971.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. **Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado.** Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 35, p. 203-206, 2008.

FREITAS, M.F.L.; et al. **Perfil da sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do**

estado de Pernambuco. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FU-REN, F.; FAN ALLEN, J. B. **Chemical, electrochemical, gravimetric, and microscopic studies on antimicrobial silver films.** The Journal of Physical Chemistry B, p. 279-287, 2002.

FURST, A; RADDING, S. B. **Silver.** Volume 3, p. 144. 1998.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos.** São Paulo: varela, 2001. 629p.

GLOVER, A. D.; PUSCHNER, B.; ROSSOWA, H. A.; LEHENBAUERA, T. W.; CHAMPAGNEA, J. D.; BLANCHARDE, P. C.; ALYA, S. S. **A double-blind block randomized clinical trial on the effect of zinc as a treatment for diarrhea in neonatal holstein calves under natural challenge conditions.** Preventive Veterinary Medicine, 112, p. 338– 347, 2013.

GONG, P.; LI, H.; HE, X.; WANG, K.; HU, J.; TAN, W. **Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄Ag nanoparticles.** Nanotechnology, 18:604–11, 2007.

GRACIA, R. **Encyclopedia of Toxicology: Óxido de zinco.** Elsevier, 2005.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123694000010267>> Acesso em: 07 jan. 2016.

GRASS, G.; WONG, M.D.; ROSEN, B.P.; SMITH, R.L.; RENSING, C. **ZupT is a Zn(II) uptake system in Escherichia coli.** J. Bacteriol., 184, p. 864–866, 2002.

GREWAL, J. S.; TIWARI, R. P. **Resistance to metal ions and antibiotics in Escherichia coli isolated from foodstuffs.** Journal of Medical Microbiology, 32 (4), p. 223–226, 1990.

GUPTA, A.; MAYNES, M.; SILVER, S. **Effects of halides on plasmid mediated silver resistance in Escherichia coli.** Applied and Environmental Microbiology., 64 (12), p. 5042–5045, 1998.

HEO, J. M., KIM, J. C., HANSEN, C. F., MULLAN, B. P., HAMPSON, D. J., PLUSKE, J. R. **Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen,**

faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. Archives Animal Nutrition, 62, p. 343–358, 2008.

HEO, J. M.; OPAPEJU, F. O. **Gastrointestinal health and function in weaned pigs:** a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition., 97(2), p. 207–237, 2012.

HEO, J.M.; KIM, J.C.; HANSEN, C.F; MULLAN, B.P; HAMPSON, D.J.; MARIBO, H.; KJELDSEN, N.; PLUSKE, J.R. **Effects of dietary protein level and zinc oxide supplementation on the incidence of post-weaning diarrhoea in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli.** Livestock Science, 133, p. 210–213, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). **Produção da pecuária municipal.** Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39, 2014.

IP, M.; LUI, S. L.; POON, V. K. M; IVAN, L. I.; BURD, A. **Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison.** Journal of Medical Microbiology. 55, p. 59–63, 2006.

ITV: ÍNDICE TERAPÊUTICO VETERINÁRIO. Rio de Janeiro, Epub, 4. ed., 2010, p. 301.

J. LIEDTKE, W. VAHJEN. **In vitro antibacterial activity of zinc oxide on a broad range of reference strains of intestinal origin.** Veterinary Microbiology, 160. p. 251–255, 2012.

JALAI, R.; et al. **ZnO nanofluids:** green synthesis, characterization, and antibacterial activity, Mater. Materials Chemistry and Physics, p.198–201, 2010.

KING, R. B. **Encyclopedia of Inorganic Chemistry.** New York, United States: John Wiley and Sons Ltd., 1994.

KLASEN, H. J. **A historical review of the use of silver in the treatment of burns.** Part I early uses. Burns, 30:1–9, 2000.

KONEMAN, E.; et al. **Diagnóstico microbiológico.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KREWER, C.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de micro-organismos isolados de mastite bovina e bubalina no Nordeste do Brasil.** 107f. 2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; SINGH, R. S. **Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle.** Current Microbiology, New York, v. 60, n. 5, p. 379-386, 2010.

LADEIRA, S. R. L. Mastite bovina. In: doenças de ruminantes e equinos. São Paulo: Varela, 2001. v.1. 426p.

LANDSDOWN, A.B.G. **Silver I:** its antibacterial properties and mechanism of action. J Wound Care, 11:125–38, 2002.

LEE, J.D. **Química Inorgânica não tão concisa.** São Paulo, Brasil: Edgard Blücher, 2000.

LIPSKY, B. A.; HOEY, C. **Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds.** Clinical Infectious Diseases, 49, p.1541-1549, 2009.

LOH, J. V.; PERCIVAL, S. L.; WOODS, E. J. **Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals.** International Wound Journal, 6, p. 32-37, 2009.

LOWY, F. D. **Antimicrobial resistance:** the example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation, Ann Arbor, v. 119, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. **Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 278-282, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; Parker, J. ; **Microbiologia de Brock** . 12. ed., São Paulo : Pearson Prentice Hall, 2010.

MARTIN, B. S. **Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastites en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región.** Archivos de medicina veterinaria, v. 34, 2002.

MCDougall, S. et al. **A review of prevention and control of heifer mastitis via nonantibiotic strategies.** *Veterinary Microbiology*, v. 134, n. 2, p. 177- 185, 2009.

MCHUGH, G.L.; MOELLERING, R.C.; HOPKINS, C.C.; SWARTZ, M.N. ***Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin.** *Lancet*, p. 235–240, 1975.

MCREE, A.E. **Therapeutic review: silver.** *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24, p. 240–244, 2015.

MEDEIROS, E. S. **Perfil da sensibilidade in vitro dos *Staphylococcus* spp. Frente a antimicrobianos e desinfetantes utilizados no controle da mastite bovina.** 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. **Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?** *The Veterinary Journal.*, 171, p. 398-40, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis.** Brasília: Ministério da Saúde; 4. ed., 140 p. 2006.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Brasil). **Projeções do agronegócio.** Brasília, 6. ed., p. 1-133, 2015.

MIRSATTARI, S. M.; HAMMOND, R. R.; SHARPE, M. D. **Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver.** *Neurology*, 62: p.1408-1410, 2004.

MOONEY, E. K. **Silver dressings.** *Plast Reconstr Surg*, 117: 666-669, 2006.

MOTA, R. A. et al. **Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil).** *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 13, n. 1, p. 124-130, 2012.

MOYER, C. A.; BRENTANO, L.; GRAVENS, D. L.; MARGRAF, H. W.; MONAFO, W. W. **Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution.** *Archives of Surgery*, 90:812–67. 1965.

MULLEY, G.; JENKINS, A. T. A.; WATERFIELD, N.R. **Inactivation of the Antibacterial and Cytotoxic Properties of Silver Ions by Biologically Relevant Compounds.** Plos one, v.9, 2014.

NEUWIRTH, R.S.; SINGER, A. **Evaluation of a Silver Nitrate Endometrial Ablation Fluid Delivery System as a Chemical Treatment for Menorrhagia.** Journal of Minimally Invasive Gynecology, v. 20, n. 5, 2013.

OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. **Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Oxford, v. 57, n.3, p. 450-460, 2006.

OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R. R. **Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics.** Canadian Journal of Veterinary Research, 66, p.86, 2002.

ÖZLER, G.S. **Silver nitrate cauterization: A treatment option for aphthous Stomatitis.** Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, p. 281-283, 2014.

PAGLIUCA, L. M. F.; FIALHO, A. V. M.; SIMAS, Z. A.; SILVA, R. P. M. **Agentes químicos profiláticos da oftalmia neonatal: estudo exploratório.** Cogitare Enfermagem, 2(1), p. 18-20, 1997.

PANYALA, N. R.; PENA-MENDEZ, E.N.; HAVEL, J. **Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?** Journal of Applied Biomedicine, p. 117-129, 2008.

PASSOS, A. F.; AGOSTINI, F. S. **Conjuntivite neonatal com ênfase na sua prevenção.** Rev. bras. Oftalmol., v.70, n.1, Rio de Janeiro, 2011.

PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. **Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes.** Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 70(4): p. 391-395, 2003.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. **Bacterial resistance to silver in wound care.** Journal Hospital Infection, 60: p. 1-7, 2005.

PETTIGREW, J.E.; **Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs; dietary tools. Part 1.** Animal Biotechnology., 17, p. 207–215, 2006.

PIMENTEL, L. C. F.; CHAVES, C. R.; FREIRE, L. A. A.; AFONSO, J. C. **O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado.** Quim. Nova, v. 29, n. 5, p. 1138-1149, 2006.

PLUSKE, J.R.; HANSEN, C.F.; PAYNE, H.G.; MULLAN, B.P.; KIM, J.C.; HAMPSON, D.J.; **Gut health in the pig.** In: Paterson, J.E., Barker, J.E. (Eds.), Manipulating Pig Production XI. Australasian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia, p. 147–158, 2007.

POON, V.K, BURD, A. **In vitro cytotoxicity of silver:** implication for clinical wound care. Burns, 30, p.140-147, 2004.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 9. ed., 2002.

RAGHUPATHI, K.R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. **Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles.** Langmuir, v. 27. p. 4020-4028, 2011.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. **Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.** Biotechnology Advances, 27, 76–83, 2009.

RAMALHO, A. C.; SOARES, K. D. A.; SILVA, D. F.; BARROS, M. R. C.; JÚNIOR, J. W. P.; OLIVEIRA, J. M. B.; MOTA, R. A.; MEDEIROS, E.S. **Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros.** Pesquisa Veterinária Brasileira. 32(12), p.1285-1288, 2012.

RICHARD, J. W.; SPENCER, B. A.; MCCOY, L. F. **Acticoat TM versus Silverlons: the truth.** Journal of Burns Surgical Wound Care,1:11, 2002.

ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A. GUERRA, W. **Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana.** Quimica Nova, v.34, n.1, p. 111-118, 2011.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. **Antimicrobial activity and action of silver.** Progress in Medicinal Chemistry, 31, p. 351-370, 1994.

SAMPIMON, O. C.; LAM, T. J. G. M.; MEVIUS, D. J.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. **Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples.** Veterinary Microbiology, 150, p.173–179, 2011.

SARKAR, S.; JANA, A. D.; SAMANTA, S. K. Golam Mostafa. **Facile synthesis of silver nano particles with highly efficient anti-microbial property.** Polyhedron, 26, p. 4419–4426, 2007.

SAWAI, J. et al. **Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay.** Elsevier Science B.V., 2003.

SAWAI, J.; et al. **Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity.** Journal of Chemical Engineering of Japan, 1996.

SAWAI, J.; et al. **Escherichia coli damage of bacteria and ZnO particles.** ceramic powder slurries. Journal of Chemical Engineering of Japan, 1997.

SAWAI, J.; et al. **Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method.** Journal of the Ceramic Society of Japan, 1995.

SAWAI, J.; et al. **Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 86, p. 521-522, 1998.

SAWANT, A. A.; GILLESPIE, S. P.; OLIVER, S. P. **Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk.** Veterinary Microbiology, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 73-81, 2009.

SEIXAS, R.; SANTOS, J. P.; BEXIGA, R.; VILELA, C. L.; OLIVEIRA, M. **Short communication:** Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal. Journal of Dairy Science, v. 97, n.1, 2014.

SHARMA, R.; RENSING, C.; ROSEN, B. P.; MITRA, B. **The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from Escherichia coli.** The Journal of Biological Chemistry, 275, p. 3873–3878, 2000.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. **Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds.** *Veterinary microbiology*, Amsterdam, v.106, p. 103-107, 2005.

SILVA, R. W. S. M.; OLIVEIRA, J.C.P.; EGGLETON, C. M. J. ECHEVARRIA, F.; PINHEIRO, A. C. **Sistemas de criação de bovinos de leite para a região sudeste do Rio Grande do Sul.** Empraba Pecuária Sul, versão eletrônica, 2008. Disponível em:
<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/BovinoLeiteRegiaoSudoesteRioGrandeSul/manejo.htm>> Acesso em: 15 jan. 2016.

SILVER, S. **Bacterial resistances to toxic metal ions – a review.** *Gene*, 179, p. 9-19, 1996.

SILVER, S. **Bacterial silver resistance:** molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, p. 341-353, 2003.

SIMÕES, T. V. M. D.; OLIVEIRA, A. A. **Mastite bovina: considerações e impactos econômicos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, 2012.

SNEL, G. G. M.; MALVISI, M.; PILLA, R.; PICCININI, R. **Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis.** *Research in Veterinary Science*, 96, p. 25–27, 2014.

SODERBERG, T. A.; et al. **Antibacterial effect of zinc oxide in vitro.** *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, p.193-197, 1990.

SOUZA, G. D.; RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. **Prata:** breve histórico, propriedades e aplicações. *Educação química*, 24(1), p.14-16, 2013.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 4ªed. Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan, 2006, p. 449, 709.

TAPONEN, S.; PYORALA, S. **Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis - not so different from *Staphylococcus aureus*?** *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 29-36, 2009.

THE INDEX MERCK; 13. ed., Merck & Co. Inc.: Darmstadt, 2001.

THE MERCK CHEMICAL DATABASE, Merck KGaA: Darmstadt, 2005.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 21 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 1985.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. **Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária, v.6, n.10, 2008.

TREMBLAY, Y. D. N.; LAMARCHE, D; CHEVER, P.; HAINE, D.; MESSIER, S.; JACQUES, M. **Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms.** J. Dairy Sci., 96, p. 234–246, 2013.

TROP, M.; NOVAK, M.; RODL, S. **Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient.** Journal of Trauma, p. 648-652, 2006.

VAHJEN, W., PIEPER, R., ZENTEK, J. **Bar-coded pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons reveals changes in ileal porcine bacterial communities due to high dietary zinc intake.** Appl. Environ. Microbiol., 76, p. 6689–6691, 2010.
VETERINARY TOXICOLOGY. Elsevier Inc. Cap.37, 2007.

WAHAB, R., et al. **Antibacterial activity of ZnO nanoparticles prepared via nonhydrolytic solution route.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 87, p.1917-1925, 2010.

WANG, Y. et al. **Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis.** Veterinary Microbiology, Amsterdam, v. 130, n. 1-2, p. 118-125, 2008.

WATTS J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. Veterinary Microbiology., 16, p. 41-59, 1988.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK L. J. V. **The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Oxford, v. 51, p. 9-11, 2003.

WEDEKIND, K.J.; HORTIN, A.E.; BAKER, D.H. **Methodology for assessing zinc bioavailability:** efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. *Journal Animal Science*, 70, p.178–187, 1992.

WOODS E.J.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. **Prevalence of silver resistance genes in bacteria isolated from human and horse wounds.** *Veterinary Microbiology*, 138, p. 325–329, 2009.

WRIGHT, J. B.; LAM, K.; BURRELL, R. E. **Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance:** a role for topical silver treatment. *American Journal of Infection Control*, 26, p.572-577, 1998.

YOKOIA, E. **Controle de infecções intramamárias no gado leiteiro usando as propriedades antibacterianas e cicatrizantes do muco de escargots *Achatina sp.* no pré e pós-dipping.** 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Pirassununga-SP.

ZADOKS, R. N. W. P. et al. **Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing.** *Journal of clinical microbiological*, v.40, p.3894-3902, 2002.

ZHANG, B; GUO, Y. **Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occluding and zonula occludens protein 1 (ZO-1) expression in weaning piglets.** *British Journal of Nutrition*, v.102, p.687-693, 2009.

ZORZETTO, R. **O alívio do sal:** Nitrato de prata funciona contra o acúmulo de líquido entre as membranas pulmonares. *Revista pesquisa Fapesp*, ed. 104, 2004.

4. ARTIGO

Soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos

Ana Paula Pereira Alves, Vinicius da Silva Amorim, Dielson da Silva Vieira, Rodolfo de Moraes Peixoto, Helinando Pequeno de Oliveira, Mateus Matiuzzi da Costa

Artigo submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos

Ana Paula P. Alves^{1*}, Vinicius da Silva Amorim², Dielson da Silva Vieira³, Rodolfo de Moraes Peixoto⁴, Helinando Pequeno de Oliveira⁵, Mateus Matiuzzi da Costa⁶

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial das soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos (*in situ*), considerando a escassez de literatura a respeito do uso destes compostos na profilaxia de mastites. Primeiramente foram realizados ensaios de microdiluição e CBM (Concentração Bactericida Mínima) a fim de verificar a atividade antimicrobiana das soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata sobre 30 isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de casos de mastite. Todos os isolados apresentaram sensibilidade às duas soluções testadas, mas a solução de nitrato de prata apresentou menores valores de CBMs (97,65 a 3,05 µg/mL), quando comparada as CBMs da solução de óxido de zinco (6.250 a 97,65 µg/mL). Posteriormente, foram conduzidos os ensaios de antissepsia dos tetos (*in situ*) através da imersão dos mesmos nas soluções antimicrobianas testadas. Para isso, foram utilizados 40 tetos (n=40) oriundos de vacas abatidas, os quais foram divididos em 4 grupos de 10 tetos, destinados ao teste das soluções de óxido de zinco (3%), de nitrato e prata (1%) e seus respectivos controles. Os tetos foram submetidos à contagem de microrganismos mesófilos na superfície dos tetos (UFC/cm²) ante e após a imersão nas soluções testadas. Como resultado, todas as soluções (de óxido de zinco e de nitrato de prata) apresentaram significativa redução de UFC/cm² até aos 60 minutos após a imersão (M 10' a M 60'). A solução de nitrato de prata apresentou redução de UFC/cm² significativamente maior, quando comparado ao grupo testado com solução de óxido de zinco. Tais resultados validam o potencial das soluções de óxido de zinco e nitrato de prata para utilização no pré e pós-dipping em vacas leiteiras.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: antissepsia de tetos, óxido de zinco, nitrato de prata, bovinos.

ABSTRACT: This study aimed to analyze the zinc oxide and silver nitrate solutions as an alternative antiseptic for cow teats (*in situ*), considering the lack in the literature about these compounds uses in mastitis prophylaxis. First microdilution tests and MBC (Minimal Bactericidal Concentration) were performed in order to determine the antimicrobial activity of zinc oxide and silver nitrate solutions over 30 *Staphylococcus* spp. isolates, obtained from cows with mastitis. All strains tested showed sensitivity to both solutions, but the silver nitrate solution had lower MBC

values (97.65 to 3.05 ug/ml) compared with zinc oxide solution MBCs (97 to 6,250, 65 ug/ml). Subsequently, the antiseptic teat tests were conducted (in situ) by immersing the teats in same antimicrobial solutions tested in the first experiment. Therefore, 40 teats were used (n = 40) originating from slaughtered cows were divided into 4 groups of 10 teats, to test zinc oxide (3%) and silver nitrate (1%) solutions and their respective controls. The teats were submitted to mesophilic count on the teat surface (CFU/cm²) before and after immersion in tested solutions. As a result, all the solutions (zinc oxide and silver nitrate) had a significant reduction in CFU/cm² until 60 minutes after immersion (M 10' to 60 M'). Silver nitrate solution showed a reduction of CFU/cm² significantly higher compared to the group treated with zinc oxide solution. These results validate the potential use of zinc oxide and silver nitrate solutions in dairy cows as a pre- and post-dipping antiseptic.

INDEX TERMS: teats antiseptics, zinc oxide, silver nitrate, cattle

INTRODUÇÃO

No ano de 2014, o efetivo total do rebanho de bovinos no Brasil foi de 212,34 milhões de cabeças, desse total 10,9% corresponde a vacas ordenhadas. Este índice coloca o país na segunda posição mundial em relação ao efetivo de vacas ordenhadas, ficando atrás apenas da Índia (IBGE, 2014).

Tais índices expressam a importância que a pecuária leiteira adquiriu no país, motivada pelo seu desempenho econômico, pela geração de empregos permanentes (ZOCCAL et al., 2011), e ainda pela importância do leite na alimentação humana, devido à sua riqueza em nutrientes proporcionando um conjunto abrangente de benefícios para a saúde (GOMES et al., 2008).

Apesar do Brasil apresentar destaque na pecuária leiteira mundial, o leite oriundo de algumas criações continua a apresentar baixa qualidade microbiológica tendo em vista as más condições higiênico-sanitárias; o estado de saúde dos animais e cuidados inadequados com utensílios e equipamentos utilizados nos procedimentos de ordenha (SIMÕES, 2012). Este cenário proporciona uma prevalência acentuada da mastite no rebanho, enfermidade de natureza plurietiológica, que compromete o desempenho da atividade leiteira através de significativas reduções na produção e qualidade do leite, perdas pelo descarte de

animais e custos com o tratamento (CONTRERAS et al., 2007; RADOSTITS et al., 2002).

O plano de controle e prevenção da mastite é provido de diversas estratégias, tais como higienização do ambiente; dos equipamentos e a lavagem do úbere antes da ordenha, as quais reduzem o número de microrganismos patogênicos (QUINN, et al. 2005). Contudo, a antissepsia de tetos antes (*pré-dipping*) a após (*pós-dipping*) a ordenha constitui-se das mais eficazes estratégias de controle da mastite contagiosa e ambiental, já que o teto, além constar uma microbiota intrínseca, é contaminado com bactérias oriundas do ambiente (COSER, LOPES E COSTA, 2012; FONSECA e SANTOS, 2007).

Um número limitado de antissépticos químicos pode ser usado na lavagem de tetos, tais como, soluções a base de cloro, iodóforos, compostos quaternários de amônia. A limitação está associada a uma série de exigências que devem ser cumpridas para seu uso com eficácia e segurança (PEDRINI e MARGATHO, 2003). Além disso, a emergência de cepas bacterianas resistentes a desinfetantes utilizados em *pré* e *pós-dipping* podem dificultar programas de prevenção e controle de mastite nos rebanhos leiteiros. Tais pressupostos são embasados na existência de variações no perfil de sensibilidade e resistência dos microrganismos a alguns compostos antimicrobianos já utilizados em procedimentos de antissepsia de tetos (MEDEIROS, 2008; RAMALHO et al, 2012), reascendendo a necessidade de busca contínua por novos fármacos para esta finalidade (ROCHA et al., 2011).

Partindo dessa premissa, alguns métodos alternativos de tratamento e prevenção contra mastite vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos. (ANDRADE, 2010; FACCIN, 2013; YOKOIA, 2010). Porém, todos estes estudos partem de princípios ativos de materiais orgânicos, como por exemplo, muco de escargots *Achatina* spp.; extrato de própolis e da planta aroeira.

As altas e amplas atividades antimicrobianas dos sais inorgânicos foram documentas, e vem sendo utilizadas em procedimentos terapêuticos na medicina humana e veterinária (ANVISA, 2012; BATISTUZZO, 2006; SPINOSA et al., 2006). O óxido de zinco (ZnO) caracterizou-se como um importante material industrial ao longo do tempo e atualmente vem sendo objeto de interesse considerável, por apresentar uma combinação de propriedades físicas, químicas e biológicas (ação antibacteriana) (FELTRIN, 2010). O nitrato de prata (AgNO₃), tem sido utilizado durante séculos como agentes antimicrobianos, mas o uso destes, diminuiu

drasticamente quando os antibióticos foram introduzidos nas práticas médicas (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007).

Deste modo, este ensaio teve como objetivo analisar o potencial das soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos, cujas formulações ainda não tinham sido testadas para esta finalidade.

MATERIAL E METÓDOS

Local de execução

O experimento foi executado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, localizado no Campus de Ciências Agrárias, no município de Petrolina no Estado de Pernambuco, no período de outubro de 2014 a novembro de 2015.

Determinação da atividade antimicrobiana do óxido de zinco e do nitrato de prata contra *Staphylococcus* spp. obtidos de mastite bovina, através da técnica de Microdiluição e Concentração Bactericida Mínima

Obtenção das amostras (dos isolados)

Foram utilizados 30 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos da bacterioteca do laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, resultantes de experimentos executados por Krewer (2013), que recuperou estes microrganismos a partir do leite de vacas com mastite clínica e subclínica oriundas de propriedades dos estados da Bahia e de Pernambuco, sendo localizadas no Vale Submédio São Francisco e no Agreste Pernambucano.

Obtenção e preparo dos agentes antimicrobianos

Todos os isolados bacterianos foram testados frente aos dois compostos inorgânicos: óxido de zinco (ZnO) e nitrato de prata (AgNO₃), ambos provenientes do Laboratório de Ciências dos Materiais da UNIVASF. Antes da sua utilização nos ensaios de microdiluição e CBM, as soluções do óxido de zinco e de nitrato de prata

foram preparadas a partir de água destilada esterilizadas a uma concentração final de 25 mg/mL.

Microdiluição e CBM

A atividade antimicrobiana do óxido de zinco e do nitrato de prata foi determinada utilizando o método de microdiluição, baseado no documento M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com pequenas modificações.

Após o processo de replicação dos 30 isolados, deu-se início ao procedimento de microdiluição, ao realizar a técnica padrão de turvação a 0,5 na escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL), utilizando-se solução salina a 0,85%. Depois, adicionou-se 0,1 mL da suspensão turva (solução salina com isolados de *Staphylococcus* spp.) a 9,9 ml de caldo Mueller Hinton (MH) em tubos de ensaio. Para cada grupo do antimicrobiano testado (óxido de zinco e nitrato de prata), foram produzidos 30 tubos de ensaios contendo 10 mL da solução composta por 9,9 mL de caldo MH adicionado de 0,1 mL da suspensão de *Staphylococcus* spp.

Logo após, procedeu-se com a microdiluição em microplacas na capela de fluxo laminar. Inicialmente, com o auxílio da micropipeta multicanal, coloca-se 200 µl de caldo MH, puro e estéril em cada poço da microplaca, procedendo-se logo em seguida com a diluição do óxido de zinco e nitrato de prata, colocando-se 200 µl dos mesmos nos primeiros poços, seguindo-se uma diluição de 1:2 e descartando-se os últimos 200 µl. Assim, obtiveram-se diferentes concentrações ao longo dos oito poços das microplacas: 1^a- 12.500 µg/mL; 2^a- 6.250 µg/mL; 3^a- 3.125 µg/mL; 4^a- 1.562,5 µg/mL; 5^a- 781,2 µg/mL; 6^a- 390,6 µg/mL; 7^a-195,3 µg/mL; 8^a- 97,6 µg/mL. Em seguida adiciona-se 10 µL de caldo MH contendo os micro-organismos em cada poço. As microplacas também continham os poços de controles positivo e negativo. No último colocou-se apenas o caldo MH, sem adição do antimicrobiano testado (Nitrato de prata) e sem a solução com os *Staphylococcus* spp, afim de garantir a esterilidade do meio ao longo do teste. Nos poços de controle positivo, encontravam-se o caldo MH inoculado com os isolados de *Staphylococcus* spp. utilizados, afim de verificar a viabilidade dos isolados. Em seguida, as microplacas foram encaminhadas a estufa, sendo incubadas a 37°C por 24 horas.

Decorridas as 24 horas, iniciou-se o teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima), com o auxílio de um replicador de microplacas, inoculou-se o conteúdo de cada poço da microplaca em placas de petri contendo MH Agar. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Decorrido esse tempo, foi efetuada a leitura das placas. O poço na menor concentração que não foi observado nenhum crescimento bacteriano é considerada a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Todas as amostras foram testadas em triplicata testadas em triplicata (LENNETTE et al., 1985). Com o objetivo de comparar as CBMs obtidas frente as soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata, empregou-se o teste de Wilcoxon.

Teste das soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como antissépticos de tetos bovinos (teste *in situ*)

Delineamento experimental e obtenção dos tetos

Foram utilizados um número amostral de 40 tetos de vaca (n=40), sendo este total dividido em 04 grupos de 10 tetos. Um (01) grupo foi destinado ao teste com as soluções de óxido de zinco à 3%, denominado Tratamento Óxido de Zinco, sendo paralelamente testado com outro grupo de tetos (n=10), denominado Tratamento Controle óxido de zinco, utilizando a solução controle a base de dicloroisocianurato de sódio anidro, preparada conforme recomendação do fabricante. Da mesma forma, outro grupo de tetos foi destinado ao teste com soluções de nitrato de prata à 1%, denominado Tratamento Nitrato de Prata, sendo paralelamente testado com outro grupo de tetos (n=10), denominado Tratamento Controle nitrato de prata, utilizando a solução controle a base de dicloroisocianurato de sódio anidro.

Os 40 tetos (n=40) foram obtidos a partir de vacas abatidas no abatedouro municipal de Petrolina-PE. Logo após o abate, quando ainda as vacas eram encontradas na linha de abate, os tetos foram retirados e imediatamente acondicionados em sacos plásticos estéreis, e devidamente lacrados foram colocados numa caixa isotérmica com gelo. Em seguida os tetos foram encaminhados até o laboratório de Imunologia e Microbiologia Animal da UNIVASF, dando início ao procedimento de higienização dos tetos utilizando soluções de óxido de zinco e nitrato de prata através do método de imersão.

Realização de higienização dos tetos utilizando soluções de óxido de zinco e nitrato de prata através do método de imersão (teste *in situ*)

Primeiramente, foi marcado o local de coleta dos espécimes clínicos no teto, demarcando uma área de 4cm² na superfície da região mediana do teto com o auxílio de um molde de papel cartolina esterilizado. Para coleta a coleta dos espécimes clínicos foram realizados quatro movimentos cruzados através de um swab bacteriológico estéril (FINGER, 2001).

Para avaliação do efeito das soluções dos compostos inorgânicos óxido de zinco e nitrato de prata, foi realizado um (01) swab antes da imersão dos tetos nas soluções, sendo denominado como Momento 0'. Em seguida, foi procedida a imersão dos tetos nas soluções antimicrobianas, por um período de 30 segundos. Dez (10) minutos após a imersão, procedeu-se realização de outro swab na mesma área delimitada, sendo denominado Momento 10'. Mais dois (02) swabs foram realizados na área delimitada na superfície do teto, aos 30 minutos e 60 minutos após a imersão, períodos denominados como Momento 30' e Momento 60', respectivamente.

Realização de plaqueamento em profundidade ou Pour Plate

Após a coleta, cada "swab" foi acondicionado imediatamente em um tubo de ensaio esterilizado, contendo água peptonada. A partir deste tubo, realizaram-se diluições sucessivas até 10⁻⁴ em tubos de ensaio contendo caldo Muller Hinton. Em seguida, próxima ao bico de bunsen, inoculou-se 1 mL de cada diluição em placas de petri estéreis e vazais, e em seguida, verteu-se 15 mL de meio PCA (Contagem Padrão em Placa) nas placas inoculadas, misturando o meio com o inóculo através de movimentos circulares. Aguardou-se a completa solidificação do meio de cultura, até que as placas foram encaminhadas a até a estufa, a 37°C por um período de 48 horas. Os testes foram conduzidos em duplicata (SILVA et al., 2007).

Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e cálculo dos resultados

Após as 48 horas de incubação, as placas foram submetidas a contagem das colônias com o auxílio da lupa de um contador de colônias. Para contagem, foram selecionadas placas sem espalhamento, e para efeito do cálculo foram consideradas as placas com número de 30 a 300 colônias. Para o cálculo das unidades formadoras de colônias, foram consideradas a média aritmética das contagem de colônias das placas em duplicata e multiplicou-se pelo inverso das diluições. Também, foi devidamente procedida a transformação dos valores de UFC para UFC/cm², após considerar que as amostras foram preparadas pela técnica de esfregação de superfície (SILVA et al., 2007).

Análise estatística dos dados

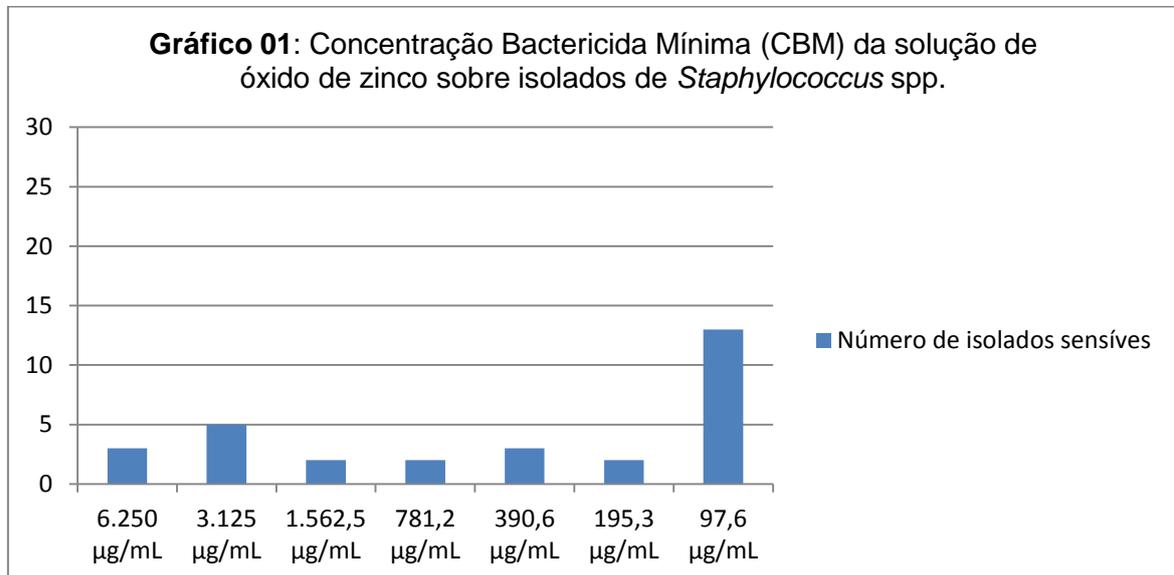
A ausência de normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Dessa forma, os valores obtidos para UFC/cm² foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) para análise estatística, e a função antilogarítmica para apresentação dos resultados. Os valores obtidos de UFC/cm² foram comparados entre os tratamentos, utilizando-se a análise de variância para amostras independentes e entre os momentos experimentais pela análise de variância para medidas repetidas. Empregou-se o teste de Bonferroni para comparação das médias. Para análise dos dados, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana da solução de óxido de zinco

Houve diferença significativa ($p < 0.01$) quando comparou-se os valores de CBMs das soluções de óxido com as CBMs das soluções de nitrato de prata. Todos os isolados de *Staphylococcus* spp. testados apresentaram sensibilidade ao óxido de zinco, mas com uma distribuição desuniforme dos valores das CBMs. Tais isolados exibiram uma variação de 6.250 a 97,65 µg/mL, sendo que 43,3% dos mesmos foram sensíveis a menor concentração (97,65 µg/mL) (**Figura 01**). A média

e a mediana obtidas dos valores das CBMs da solução do óxido de zinco foram 1.396,48 µg/mL e 292,96 µg/mL, respectivamente.



A partir da década de 90, alguns pesquisadores intensificaram as investigações a respeito do potencial de óxido de zinco como antimicrobiano, certificando que *Staphylococcus aureus* exibia uma alta sensibilidade ao óxido de zinco, o que não foi demonstrado para a espécie *Escherichia coli* (SAWAI, 1995). Soderberg et al. em 1990, verificaram que as bactérias gram positivas são mais susceptíveis ao óxido de zinco, comparada as gram negativas. Estas não foram inibidas mesmo sendo submetidas a altas concentrações, ao tempo em que isolados de *Staphylococcus epidermidis* exibiram uma notável sensibilidade ao ZnO.

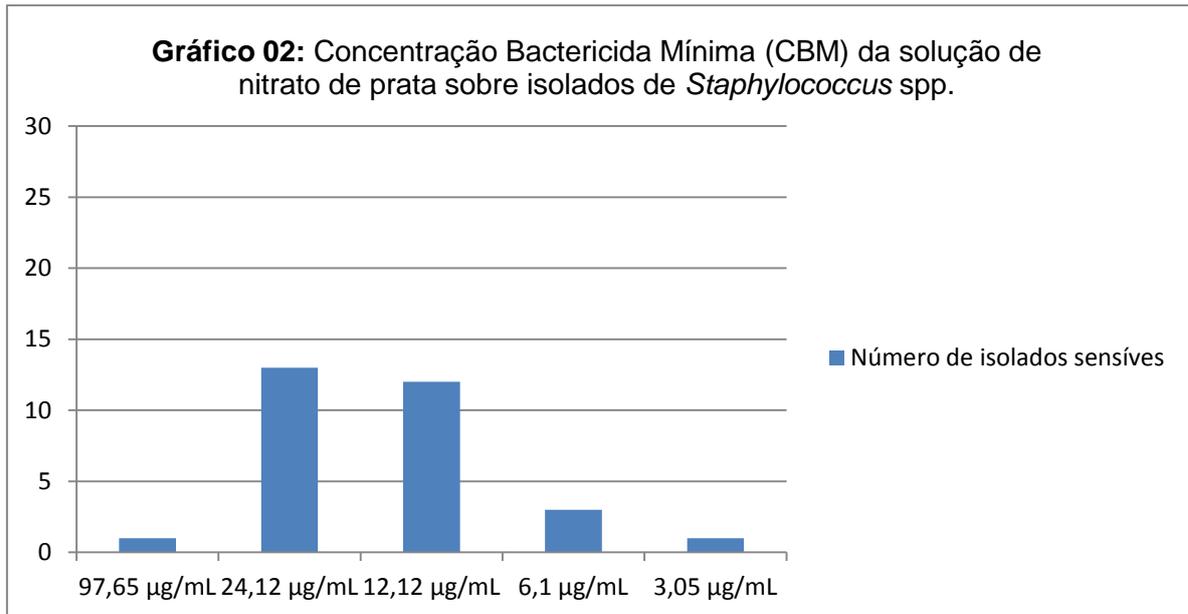
Alguns pesquisadores tentaram elucidar o mecanismo de ação do ZnO. Um dos pontos a serem considerados é o fato do ZnO ser altamente insolúvel em água, mas exibe maior solubilidade em condições ácidas. Nessa situação, o ZnO dissocia-se liberando Zn^{+2} , o qual pode exercer funções bactericidas, pois o efeito antimicrobiano dos metais pesados, geralmente, está associado a sua forma iônica, assim como ocorre com o elemento prata (Ag). Alguns autores associam este princípio ao efeito resultante da aplicação do óxido de zinco na prevenção de diarreias neonatais em suínos (LIEDTKE e VAHJEN, 2012; SILVER, 1996). Contudo, existem especulações de que a própria molécula de óxido de zinco (ZnO) tem um efeito negativo sobre o crescimento bacteriano.

Sawai et al. (1998, 2003) propuseram que a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a partir da molécula de ZnO, pode ser o fator principal da atividade antimicrobiana do óxido de zinco. Os mesmos autores afirmaram que a taxa de dissociação do óxido de zinco em água é muito baixa, logo a formação de Zn^{+2} pouco influencia no mecanismo de ação do óxido de zinco. Para confirmar esta hipótese, os mesmos pesquisadores utilizaram soluções de $ZnCl_2$ sobre *S. aureus* e *E. coli*, em uma concentração 10 vezes maior de Zn^{+2} , em relação a quantidade desse íon obtido em soluções de ZnO. No entanto, os íons Zn^{+2} não apresentaram efeito sobre o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, sugerindo que o contato do pó de ZnO com célula bacteriana é um fator muito importante. Amornpitoksuk et al. (2011) também verificaram que a atividade antibacteriana do óxido de zinco diminuiu quando dissolvido em solução ácida, devido ao aumento da taxa de dissolução do ZnO.

Com base no exposto acima, sugere-se que o mecanismo de ação verificado neste ensaio é resultado da geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a partir da molécula de ZnO, já que utilizou-se água estéril como solvente na preparação da solução de óxido de zinco.

Atividade antimicrobiana da solução de nitrato de prata

Os isolados de *Staphylococcus* spp. também demonstraram sensibilidade à solução do nitrato de prata, com valores de CBM significadamente menores que os valores das CBMs da solução de óxido de zinco ($p < 0,01$), tendo uma variação entre 97,65 a 3,05 $\mu g/mL$ (**Figura 02**). Dos 30 isolados testados, 13 (43,3%) apresentaram valor de CBM de 24,41 $\mu g/mL$ e outros 12 (40%) isolados apresentaram valores de CBM de 12,29 $\mu g/mL$. A média e a mediana obtidas dos valores das CBMs da solução de nitrato de prata foram 19,42 $\mu g/mL$ e 12,20 $\mu g/mL$, respectivamente.



A evidência da alta atividade das soluções do nitrato de prata é condizente com os postulados de Atiyeh et al., 2007 ao afirmarem que os sais de prata foram utilizados durante séculos como agentes antimicrobianos e que o uso destes diminuiu drasticamente quando os antibióticos foram introduzidos nas práticas médicas.

O emprego dos compostos de prata na medicina se deve à atividade antimicrobiana dos íons Ag^+ , sendo seu estado elementar (Ag^0), considerado inerte ou fracamente absorvido por células bacterianas. Por isso, a prata elementar requer ionização em prol de uma eficaz atividade antimicrobiana (CASTELLANO et al. 2007; LANSDOWN, 2002; TROP, NOVAK e RODL, 2006).

O mecanismo exato de ação da prata sobre os microrganismos ainda não está plenamente elucidado, mas tem sido sugerido com base nas alterações morfológicas e estruturais verificadas nas células bacterianas (RAI, YADAV e GADE, 2009). Segundo alguns autores, os íons de prata se ligam a proteínas teciduais e causam mudanças estruturais na parede celular e na membrana citoplasmática bacteriana, levando à sua distorção e à morte. Os autores acrescentam que a prata também se liga ao DNA e RNA bacteriano exercendo desnaturação e inibindo a replicação bacteriana (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007; CASTELLANO et al., 2007; FRANCO e GONÇALVES, 2008; LANSDOWN, 2002; RICHARD, SPENCER e MCCOY, 2002).

Já outros pesquisadores mencionaram que a prata é tóxica para os microrganismos por comprometer enzimas respiratórias como a fosfomanose isomerase, bem como prejudicando algumas funções do DNA bacteriano (FOX e STANFORD, 1971). Percival, Bowler, e Russell (2005) afirmaram que a ação inibidora da prata decorre, em parte, da sua acumulação dentro do organismo bacteriano e de uma forte interação com grupos tiol presentes em enzimas respiratórias das células bacterianas.

A partir dos pressupostos mecanismos de ação, algumas espécies de bactérias foram documentadas como sensíveis aos compostos de prata, tais como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococos* resistentes à vancomicina (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007). Como também, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii* (IP et al., 2006), *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus flexneri*, e *Staphylococcus typhimurium* (SARKAR et al., 2007).

Teste das soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como antissépticos de tetos bovinos (teste *in situ*)

Essa etapa do experimento visou comparar a aplicação da solução de óxido de zinco (3%) e da solução de nitrato de prata (1%), com a solução antisséptica comercial já utilizada, à base de dicloroisocianurato de sódio anidro, na lavagem de úbere e tetos e na desinfecção de equipamentos de ordenha. Desta forma, os efeitos dos diferentes tratamentos no procedimento de antissepsia dos tetos estão apresentados no **Quadro 1**.

Quadro 1. Medianas obtidas para UFC/cm² nos diferentes tratamentos e momentos experimentais em tetos provenientes de fêmeas bovinas.

Tratamentos	M 0'	M 10'	M 30'	M 60'
Óxido de zinco	4,95 x 10 ³ ^{ABc}	1,08 x 10 ³ ^{Bb}	0,44 x 10 ³ ^{Ba}	0,30 x 10 ³ ^{Ba}
Controle óxido de zinco	0,84 x 10 ³ ^{Ac}	0,27 x 10 ³ ^{ABb}	0,05 x 10 ³ ^{ABb}	0,03 x 10 ³ ^{Aa}
Nitrato de prata	11,3 x 10 ³ ^{Bc}	0,12 x 10 ³ ^{Ab}	0,03 x 10 ³ ^{Aa}	0,03 x 10 ³ ^{Aa}
Controle nitrato de prata	2,14 x 10 ³ ^{ABc}	1,18 x 10 ³ ^{Bc}	0,23 x 10 ³ ^{ABb}	0,13 x 10 ³ ^{ABa}

Para cada momento, valores seguidos por letras minúsculas iguais não diferem entre si ($P > 0,05$); Para cada tratamento, valores seguidos por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ($P > 0,05$);

Ao observar os resultados no quadro, constata-se que todos os tratamentos foram eficazes no tocante a redução do número UFC/cm² da superfície dos tetos, devendo-se fazer algumas considerações.

O tratamento óxido de zinco foi igualmente eficaz ao seu controle ao longo dos primeiros 30 minutos, diferenciando-se somente aos 60 minutos. Neste último momento, a solução controle teve uma redução de UFC/cm² mais significativa. O tratamento nitrato de prata também foi tão eficaz quanto ao seu tratamento controle no decorrer dos 60 minutos, porém apresentou redução significativamente maior aos 10 minutos após a imersão. Estes resultados indicam que as soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata conferem proteção antimicrobiana equivalente (até superior) à solução comercial testada.

Comparando os desempenhos entre as soluções experimentais (soluções de óxido de zinco e nitrato de prata), verificou-se que em todos os momentos do ensaio (M 10', M 30' e M 60'), o grupo Tratamento Nitrato de Prata diferenciou-se do grupo Tratamento Óxido de Zinco, apresentando uma redução significativamente maior no número de UFC/cm².

É importante frisar que os tratamentos Óxido de Zinco e Nitrato de Prata estabilizaram suas atividades antimicrobianas aos 30' e 60' finais, porém, diferenças estatísticas foram observadas do número de UFC/cm² reduzidas pela ação do nitrato de prata quando comparado ao óxido de zinco no mesmo período.

Ressaltando a ação da solução nitrato de prata, observou-se que a mesma demonstrou maior atividade antimicrobiana no momento 10' quando comparado ao seu grupo controle e ao Tratamento Óxido de Zinco. Isso reflete uma particularidade da solução de nitrato de prata em reduzir o número de UFC/cm² em um menor período de tempo, fato que se apresentaria como uma vantagem no que diz respeito a sua aplicação em procedimentos de pós-dipping. Esta técnica objetiva manter uma proteção do óstio do teto contra a invasão de patógenos ambientais logo após a ordenha, já que se preconiza que somente decorridas 1-2 horas depois da ejeção do leite, o esfíncter volta ao seu estado normal (LANGONI, 2013).

Apesar da evidencia da eficaz redução em número de UFC/cm² por parte das soluções de óxido de zinco e nitrato de prata, torna-se necessária a elucidação das mesmas no tocante ao atendimento de outros critérios que devem ser seguidos para finalmente poderem ser utilizados na desinfecção de tetos na rotina de ordenha de bovinos. Devem-se considerar fatores como eficácia sobre os agentes envolvidos na mastite; tempo de ação compatível ao manejo a que os animais são submetidos; e pouca suscetibilidade aos fatores intervenientes (presença de matéria orgânica, pH), além disso, não deve possuir efeito colateral sobre a pele do animal e não deixar resíduos no leite (SCHUCH et al., 2008).

A maioria das informações disponíveis sobre a utilidade de prata como agente antimicrobiano é derivada da literatura médica humana, especialmente em relatórios publicados a respeito de lesões térmicas. A solução de nitrato de prata (0,5%) é o fármaco de eleição para queimaduras, pois não interfere na proliferação epidérmica e possui propriedade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (MOYER et al, 1965). É válido ressaltar que estas últimas duas espécies bacterianas são também consideradas agentes etiológicos da mastite. Mais aplicações tópicas dos compostos de prata são relatadas. O nitrato de prata é o tratamento preconizado para granulomas umbilicais de recém-nascidos, com a finalidade de reduzir o risco de infecção umbilical (BRODSGAARD et al., 2015). Solução aquosa contendo sais de prata é instilada nos olhos de crianças recém-nascidas para evitar infecções oculares neonatais (SILVER, 2003). Nitrato de prata também foi utilizado na cauterização de estomatite aftosa em humanos (ÖZLER, 2014).

Na medicina veterinária, os compostos de prata são também utilizados em queimaduras, sendo administrados em equinos, animais de produção, em animais

de companhia e até em espécies exóticas laboratoriais (McREE, 2015). A sulfadiazina de prata é o composto de eleição para o tratamento de queimaduras, quando comparado ao uso do nitrato de prata para esta mesma finalidade (SPINOSA et al., 2006).

Em se tratando em tempo de ação, os íons de prata podem apresentar outra característica benéfica no sentido de prolongar a proteção do óstio após a ordenha. Faz-se referência a um estudo publicado em 2015 constatando que *Pseudomonas aeruginosa* mortas em solução de nitrato de prata, exerciam efeitos bactericidas quando foram colocadas em contato com outras bactérias vivas. Os pesquisadores descobriram que os íons de prata alojam-se nas membranas bacterianas abrindo caminho pelo seu interior e criando uma espécie de vesícula, de onde saem para o exterior, provocando a morte das bactérias existentes no meio extracelular (WAKSHLAK, PEDAHZUR e AVNIR, 2015). Se essa propriedade for validada, a ação antimicrobiana das soluções de nitrato de prata poder ser prolongada, devido a um efeito residual das bactérias mortas aderidas a superfície do teto.

Relatos sobre toxicidade da prata são controversos, existindo autores que sustentam a ausência de toxicidade para células humanas (DURAN et al., 2007; SILVER, 2003) enquanto outros são mais cautelosos enfatizando que existem efeitos adversos resultantes do uso de compostos de prata (ATIYEH, COSTAGLIOLA e HAYEK, 2007; GONG et al., 2007). Caso a última afirmação venha a ser ratificada, sugere-se que a possível toxicidade do nitrato de prata possa ser minimizada, ao reduzir sua concentração nas soluções, ainda garantindo seu poder antibacteriano, já que conforme resultado deste experimento, a média obtida do ensaio de CBM com a solução de nitrato de prata foi extremamente baixa, 19,20 µg /mL. A via de aplicação é outro fator a ser considerado na minimização dos efeitos tóxicos do nitrato de prata, considerando que FURST e RADDING (1998) consideram que a absorção dérmica da prata é pouco provável.

Alguns pontos são favoráveis à aplicação da solução do óxido de zinco como antissépticos mamários. A considerar a alta afinidade do óxido de zinco com *Staphylococcus aureus* (SAWAI et al., 2003; SODERBERG et al., 1990) o principal patógeno da mastite (BRITO et al., 2001, TAPONEN e PYÖRÄLÄ, 2009). Outro fator importante é que o uso do óxido de zinco foi consolidado na farmacêutica humana com indicações para tratamentos de afecções dermatológicas, agindo como antisséptico, secativo e adstringente, através de formulações de cremes, loções,

pomadas, pasta d'água, em altas concentrações (ANVISA, 2012; BATISTUZZO, 2006).

As aplicações do óxido de zinco exibidas acima, denotam sua baixa toxicidade a células da epiderme, somado ao fato de que esse composto não é absorvido numa quantidade significativa quando aplicado à pele intacta (GRACIA, 2005).

CONCLUSÕES

A partir deste experimento foi possível afirmar que os antimicrobianos testados (soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata) foram eficazes na redução de UFC/cm² na superfície do teto, e como supracitado, pode exercer efeito antimicrobiano sobre os principais agentes etiológicos da mastite.

Portanto, deve-se considerar o potencial destes antimicrobianos no controle e prevenção da mastite, tendo em vista o nível variado de graus de susceptibilidade e resistência, já documentados, dos desinfetantes rotineiramente utilizados na pecuária leiteira brasileira.

REFERÊNCIAS

Akiyama, H. et al. Effect of zinc oxide on the attachment of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dermatological Science*, v.17, p. 67– 74, 1998.

Amornpitoksuk, P. et al. Synthesis, photocatalytic and antibacterial activities of ZnO particles modified by diblock copolymer. *Powder technology*, p. 432-438, 2011.

Andrade, U. V. C. de. Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras. 2010. 85 f. Tese (Doutorado em alimentos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR.

Anvisa. Brasil. Ministério da Saúde. Formulário nacional da farmacopeia brasileira. 2. ed. Brasília, 2012.

Atiyeh, B. S., Costagliola, M., Hayek S.N. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*, 33:139-148, 2007.

Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek S.N. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*, 33:139-148, 2007.

Batistuzzo, J.A.O. Formulário médico farmacêutico. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

Brito, M.A.V.P., et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostra de *Staphylococcus aureus* isolados de infecção intramamária bovina. *Arquivos Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, Juiz de Fora, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

Brodsgaard, A., Nielsen, T., Molgaard, U., Pryds, O., Pedersen, P. Treating umbilical granuloma with topical clobetasol propionate cream at home is as effective as treating it with topical silver nitrate in the clinic. *Foundation Acta Paediatrica*, p. 174–177, 2015.

Castellano, J.J., Shafii, S.M., Ko, F., Donate, G., Wright, T.E., Mannari, R.J. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J*, 4(2):114–22, 2007.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

Contreras, A. et al. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, p.145-153, 2007.

Coser, S.M., Lopes, M.A., Costa, G.M. Mastite bovina, controle e prevenção. *UFLA, Boletim Técnico UFLA, Lavras-MG*, n. 93, p. 1-30, 2012.

Duran, N., Marcarto, P.D., De Souza, G.I.H., Alves, O.L., Esposito, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol*, 3:203–8, 2007.

Faccin, A. Atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* de *Schinus terebinthifolius* Raddi no controle da mastite bovina. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas-RS.

Feltrin, C. W. Síntese e propriedades do ZnO: correlação entre propriedades estruturais e atividade fotocatalítica. 2010. 66f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Finger, R.M. Fatores de riscos da higiene de vacas com elevado número de bactérias mesofílicas aeróbias no leite. Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

Fonseca, L.F.L., Santos, M.V. Estratégias de controle para mastite e melhoria na qualidade do leite. Barueri: Manole, 2007.

Fox, C. L., Stanford, J. W. Anti-bacterial action of silver sulphadiazine and DNA binding. *Research in Burns*, 133-138, 1971.

Franco, D., Gonçalves, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 35, 203-206, 2008.

Furst, A., Radding, S. B. Silver. Volume 3, p. 144. 1998.

Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, X. Conhecer a importância do leite na nutrição humana. *Leite + I + D + T*, Porto, v. 2, n. 7, p. 2-4, 2008.

Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, 18:604–11, 2007.

Gracia, R. *Encyclopedia of Toxicology: Óxido de zinco*. Elsevier, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123694000010267>> Acesso em: 07 jan. 2016.

IBGE. Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39, 2014.

Ip, M. Lui, S.L., Poon, V.K.M., Lung, I. Burd, A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *Journal of Medical Microbiology*. 55, 59–63, 2006.

J. Liedtke, W. Vahjen. In vitro antibacterial activity of zinc oxide on a broad range of reference strains of intestinal origin. *Veterinary Microbiology*, 160. p.251–255, 2012.

Krewer, C.C. Caracterização fenotípica e genotípica de micro-organismos isolados de mastite bovina e bubalina no Nordeste do Brasil. 107f. 2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2013.

Langoni, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 33(5):620-626, maio 2013.

Lansdown, A.B.G. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*, 11:125–38, 2002.

Lenette, E. H. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. A. Society for Microbiology, 1985.

Mcree, A.E. Therapeutic review: silver. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24, p. 240–244, 2015.

Medeiros, E.S. Perfil da sensibilidade in vitro dos staphylococcus ssp. Frente a antimicrobianos e desinfetantes utilizados no controle da mastite bovina. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Moyer, C. A., Brentano, L., Gravens, D.L., Margraf, H.W., Monafó, W.W. Treatment Of Large Human Burns With 0.5% Silver Nitrate Solution. *Arch Surg*, 90:812p. 62–67. 1965.

Özler, G.S. Silver nitrate cauterization: A treatment option for aphthous Stomatitis. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, p. 281-283, 2014.

Pedriní, S.C.B., Margatho, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, 70(4):391-395, 2003.

Percival, S. L., Bowler, P. G., Russell, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*, 60:1-7, 2005.

Quinn, P.J. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Radostits, O. M. et al. *Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002.

Rai, M., Yadav, A., Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27, 76–83, 2009.

Ramalho, A.C., Soares, K.D.A.; Silva, D.F.; Barros, M.R.C.; Júnior, J.W.P; Oliveira, J. M.B.; Mota, R.A.; Medeiros, E.S. Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. *Pesq. Vet. Bras.* 32(12):1285-1288, 2012.

Richard, J. W., Spencer, B. A., Mccoy, L. F. Acticoat TM versus Silverlons: the truth. *J Burns Surg Wound Care*,1:11, 2002.

Rocha, D. P., Pinto, G. F., Ruggiero, R., Oliveira, C. A., Guerra, W. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quim. Nova*, v.34, n.1, p. 111-118, 2011.

Sarkar, S., Jana, A.D., Samanta, S.K., Mostafa, G. Facile synthesis of silver nano particles with highly efficient anti-microbial property. *Polyhedron*, n. 26, p. 4419–4426, 2007.

Sawai, J. et al. Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 1995.

Sawai, J. et al. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 86, p. 521-522, 1998.

Sawai, J. et al. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. Elsevier Science B.V., 2003.

Schuch, L.F.D., Wiest, J.M., Coimbra, H.S., Prestes, L.S., Toni, L., Lemos, J.S., 2008. Cinética da atividade Antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a micro-organismos relacionados a mastite bovina. *Ciência Animal Brasileira* 9, 161-169.

Silva, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 552p., 2007.

Silver, S. Bacterial resistances to toxic metal ions – a review. *Gene*, 179, p.9-19, 1996.

Silver, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *Fems Microbiol. Rev.*, 27 (2–3), 341–353, 2003.

Simões, T.V.M.D., Oliveira, A. A. Mastite bovina: considerações e impactos econômicos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa. 2012.

Soderberg, T.A., et al. Antibacterial effect of zinc oxide in vitro. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*. p.193-197, 1990.

Spinosa, H.S, Gorniak, S.L., Bernardi, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Taponen, S., Pyorala, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis - not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 29-36, 2009.

Trop, M., Novak, M., Rodl, S. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma* 60:648-652, 2006.

Wakshlak, R.B.K, Pedahzur, R., Avnir, D. Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect. *Scientific Reports*, n.5, 2015.

Yokoia, E. Controle de infecções intramamárias no gado leiteiro usando as propriedades antibacterianas e cicatrizantes do muco de escargots *Achatina sp.* no pré e pós-dipping. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Proução Animal)

- Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Pirassununga-SP.

Zoccal, R., Alves, E.R., Gasques, J.G. Diagnóstico da Pecuária de Leite nacional. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. 2011.

ANEXO A: Certificado de Aprovação na Comissão de Ética e no Uso de Animais da UNIVASF



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUISAS - CEDEP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Soluções de óxido de zinco e de nitrato de prata como alternativa para antissepsia de tetos de bovinos”, Protocolo nº 0001/071114, que utilizam 08 animais da espécie *Bos taurus* / *Bos indicus*, sob a responsabilidade de Ana Paula Pereira Alves, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled “Solutions of zinc oxide and silver nitrate as an alternative for asepsis of bovine teats”, protocol number 0001/071114, utilizing 08 animals species *Bos taurus* / *Bos indicus*, under the responsibility Ana Paula Pereira Alves, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Committee of Ethics and Deontology Studies and Research at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 30 de Abril de 2015.

Andrea Vieira Colombo – Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas - CEDEP