

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

PRATA NANOPARTICULADA PARA O CONTROLE DA MASTITE BOVINA CAUSADA
POR *Staphylococcus aureus*: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E DETECÇÃO
EM LEITE, MÚSCULO, RIM E FÍGADO

RENISON TELES VARGAS

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2018

RENISON TELES VARGAS

PRATA NANOPARTICULADA PARA O CONTROLE DA MASTITE BOVINA CAUSADA
POR *Staphylococcus aureus*: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E DETECÇÃO
EM LEITE, MÚSCULO, RIM E FÍGADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência animal da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária
Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Maria Oliveira
Pinho Cerqueira

Co-Orientadores: Profa. Dra. Marília Martins Melo
Dr. Humberto de Mello Brandão
Dr. Alessandro de Sá Guimarães

Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária –UFMG
2018

Vargas, Renison Teles, 1973-

V297p

Prata nanoparticulada para o controle da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*: validação de métodos analíticos e detecção em leite, músculo, rim e fígado. – 2018.

180p.: il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Co-orientadores: Marília Martins de Melo, Humberto de Mello Brandão, Alessandro de Sá Guimarães.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Mastite – Controle – Teses. 3. *Staphylococcus aureus* – Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Melo, Marília Martins. III. Brandão, Humberto de Mello. IV. Guimarães, Alessandro de Sá. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. VI. Título.

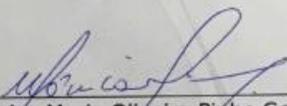
CDD – 636.214 089 69

FOLHA DE APROVAÇÃO

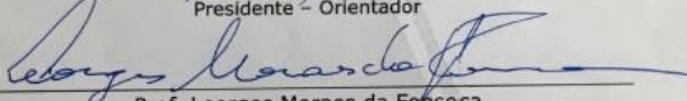
RENISON TELES VARGAS

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

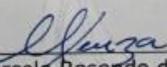
Aprovada em 26 de Janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



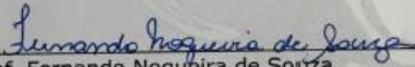
Prof^a. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Presidente - Orientador



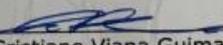
Prof. Leorges Moraes da Fonseca
Escola de Veterinária - UFMG



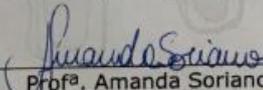
Prof. Marcelo Resende de Souza
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Fernando Nogueira de Souza
Universidade de São Paulo - USP



Dr^a. Cristiane Viana Guimarães Ladeira
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG



Prof^a. Amanda Soriano Araujo Barezani
Instituto federal de Minas Gerais - IFMG-Bambuí

DEDICATÓRIA:

Dedico este trabalho a minha família, em especial a memória da minha Mãe Maria Luzia Teles Vargas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado permissão de ter chegado até aqui e por toda força concedida na concretização deste sonho.

Em especial à minha esposa Juliana e a meus filhos João Henrique e Rafael que são o maior presente que Deus poderia ter me dado nesta vida. Por toda felicidade, carinho, compreensão, apoio, incentivo e dedicação encontrada na minha querida família que sempre farão parte de cada vitória. Amo vocês.

Aos meus pais Assis e Maria Luzia (*in memoriam*) e a toda minha família que me apoiaram em todos os momentos e contribuíram para meu crescimento profissional.

Aos meus sogros Aloysio Guimarães e Maria do Carmo e ao meu cunhado Bernardo pelo apoio constante. Vocês sempre estarão no meu coração. Obrigado por tudo que fizeram por mim em todo esse tempo.

À Professora Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira pela oportunidade de tê-la como Orientadora no Mestrado e Doutorado. Tenho muito orgulho de citá-la como umas das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, amizade, conselho e paciência.

Aos meus co-orientadores Dr. Humberto de Mello Brandão e Dr. Alessandro de Sá Guimarães da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, e à Professora Marília Martins de Melo pelos ensinamentos, amizade, e por não medirem esforços para me fornecer tudo de necessário durante o trabalho.

Aos membros da banca de defesa, pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas, funcionários e professores do DTIPOA e do DMVP da EV-UFMG pela amizade e colaboração, em especial aos Professores Marcelo Resende, Cláudia Moraes Penna, Mônica Leite e Leorges da Fonseca e aos colegas Givanildo, Vítor Santos, Leandro Facula, Letícia Oliveira, Gaby e Renata de Paolli.

À colega Cristiane Viana Guimarães Ladeira pela grande disponibilidade e enriquecedoras contribuições durante o período de conclusão dos créditos e do trabalho.

Ao colega e amigo Fernando Nogueira de Souza, que mesmo distante geograficamente, sempre presente nos momentos de dificuldade e contribuindo com ideias e conhecimento durante a execução do projeto.

Às amigas Anna Carolina Brasileiro (de longa data), Ana Cláudia Drumond e Jamilli pelo apoio e pelos bons momentos de convivência.

Ao Gabriel Barros do Lanagro (MAPA) de Pedro Leopoldo, pelas dicas e pela ajuda durante os processos de validação.

Ao Laboratório 3 RLab de Lavras, em especial ao Dr. Francisco Élcio Canuto Amaral, pelo alto nível profissional da equipe e qualidade dos serviços de análises.

Aos funcionários do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos e grandes companheiros do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG, Saulo Ribeiro, Camila Guimarães, Patrícia Andrade, Antônio Maurício Tanuri, Geovana Onorato, Isis e Danielle Cinelle que tornaram minha estadia em Juiz de Fora muito mais agradável.

Às colegas Selda e Juliana França do Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG, pelo apoio e amizade e ao funcionário Marco Aurelio Souto pelos ensinamentos e pela valorosa contribuição ao trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Análises de Alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, Nilva Martins Sanguedo, Ricardo Campos, Mario Tristão, Michelle Loures e Cecília Nogueira, pelos ensinamentos e contribuição ao meu trabalho, e principalmente pela amizade e o companheirismo durante momentos difíceis.

Ao meu ex-aluno do Curso de Zootecnia e grande amigo Pedro Augusto Andrade pelas análises estatísticas.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, Dra. Maria Aparecida V. P. Brito, Dra. Carla Lange, Dra. Letícia Mendonça, Dra. Juliana Gen, Dr. Guilherme Nunes, Dra. Vanessa Carvalho, pelos ensinamentos e colaboração durante a execução do experimento.

Aos funcionários do Campo Experimental José Henrique Brusque em Coronel Pacheco – MG, pela colaboração na fase experimental, pelo convívio, colaboração e amizade. Em especial ao Geraldinho e Amarildo pelos bons momentos e amizade.

Ao pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira e sua equipe de pesquisa do Campo Experimental José Henrique Brusque em Coronel Pacheco – MG, pela colaboração e amizade. Em especial à Doutoranda Vanessa Amarin.

À toda turminha da Bahia e demais colegas do alojamento em Coronel Pacheco – MG. Foi muito bom o contato com estudantes de “cabeça aberta” e com muitos objetivos e metas na vida.

Ao IFMG – Campus Bambuí pela minha liberação total e por ter possibilitado a realização do trabalho.

À Fapemig pela disponibilidade financeira e por custear o projeto.

À Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG pela oportunidade de utilizar suas instalações durante todo o período experimental.

Por último, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, o meu sincero reconhecimento e muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Mastite	20
2.1.1 Etiologia.....	20
2.1.2 Impacto econômico	20
2.1.3 Tratamentos convencionais	21
2.2 Nanotecnologia	22
2.2.1 Aplicabilidade de nanopartículas na Medicina Veterinária	22
2.2.2 Prata em forma de nanopartículas	22
2.2.3 Mecanismos de ação das nanopartículas de prata	25
2.2.4 Prováveis efeitos tóxicos, tópicos e sistêmicos da prata no organismo animal	
32	
2.2.4.1 Legislação	32
2.2.4.2 Intoxicação pela prata	33
2.3 Análise de resíduos de prata por métodos analíticos	36
2.3.1 Validação	36
2.3.2 Métodos de validação.....	37
2.3.2.1 Seletividade e especificidade	38
2.3.2.2 Linearidade	39
2.3.2.3 Precisão.....	39
2.3.2.4 Limite de detecção	40
2.3.2.5 Limite de quantificação.....	41
2.3.2.6 Acurácia.....	41
2.3.2.7 Robustez	42
2.4 Uso e funcionamento do ICP – OES	43
2.5 Métodos de extração (digestão).....	45
2.6 Uso de AgNp em embalagens e os riscos de migração	47
2.7 Referências Bibliográficas	48
3 HIPÓTESE	64
4 OBJETIVO GERAL.....	65
2.8 Objetivos específicos	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
Capítulo 1: Caracterização e Estudos <i>in vitro</i> de Nanopartículas de Prata (AgNp) .67	
1 Introdução	67
2 Material e Métodos	68
2.1 Caracterização das AgNp.....	68
2.1.1 Espalhamento de luz dinâmico	68
2.1.2 Microscopia de força atômica	69

2.1.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	69
2.2	Preparo dos meios de cultura e demais soluções:	69
2.3	Microrganismos utilizados e preparo do inóculo.....	70
2.4	MIC em caldo Mueller Hinton	71
2.4.1	Preparo da solução de AgNp	71
2.4.2	Preparo da solução	71
2.4.3	Leitura.....	72
2.5	MIC em Ágar Gel	72
2.5.1	Testes preliminares para verificar a diluição das AgNp	72
2.5.2	MIC em Ágar gel de BHI.....	73
2.5.3	MIC em ágar gel de MH	73
2.6	Testes de toxicidade.....	74
3	Resultados e Discussão:	75
3.1	Caracterização das AgNp.....	75
3.2	MIC em caldo MH.....	79
3.3	MIC em ágar gel	82
3.3.1	MIC em ágar gel de BHI.....	84
3.3.2	MIC em Ágar gel de MH	87
3.4	Testes de toxicidade.....	89
4	Conclusão.....	91
5	Referências Bibliográficas	92

Capítulo 2: Validação de metodologia para detecção de nanopartículas de prata em leite por Espectrometria de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES)..... 95

1	Introdução	95
2	Material e Métodos	96
2.1	Determinação da sensibilidade do equipamento.....	96
2.2	Determinação do método de digestão	97
2.3	Validação da metodologia de análise de AgNp em leite	99
2.3.1	Seletividade e especificidade.....	99
2.3.2	Linearidade	101
2.3.3	Precisão.....	102
2.3.4	Limite de detecção	102
2.3.5	Limite de quantificação	102
2.3.6	Acurácia	103
2.3.7	Robustez.....	103
2.4	Comparação entre leites com diferentes concentrações de sólidos.....	104
2.5	Verificação da presença de Ag em amostras de leite acondicionadas em embalagens de polietileno com AgNp	104
3	Resultados e Discussão.....	105
3.1	Determinação da sensibilidade do equipamento.....	105
3.2	Determinação do método de digestão	106
3.3	Validação da metodologia de análise de prata em leite	109
3.3.1	Seletividade e especificidade.....	109
3.3.2	Linearidade	111

3.3.3	Precisão.....	114
3.3.4	Limite de detecção.....	116
3.3.5	Limite de quantificação.....	116
3.3.6	Acurácia.....	117
3.3.7	Robustez.....	117
3.4	Comparação entre leites com diferentes concentrações de sólidos.....	119
3.5	Verificação da presença de Ag em amostras de leite acondicionadas em embalagens de polietileno acrescentados de AgNp.....	120
4	Conclusão.....	123
5	Referências Bibliográficas.....	124

Capítulo 3: Validação de metodologia para análise de prata em músculo, rim e fígado bovino por Espectrometria de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).....128

1	Introdução.....	128
2	Material e Métodos.....	129
2.1	Seletividade e especificidade.....	129
2.2	Linearidade.....	130
2.3	Precisão.....	131
2.4	Limite de detecção.....	131
2.5	Limite de quantificação.....	131
2.6	Acurácia.....	131
2.7	Robustez.....	132
3	Resultados.....	135
3.1	Seletividade e especificidade.....	135
3.2	Linearidade.....	137
3.3	Precisão.....	141
3.4	Limite de detecção (LD).....	144
3.5	Limite de quantificação (LQ).....	145
3.6	Acurácia.....	145
3.7	Robustez.....	147
4	Discussão.....	148
5	Conclusão.....	151
6	Referências Bibliográficas.....	151

Capítulo 4: Infecção experimental de vacas em lactação por *Staphylococcus aureus* e tratamento com nanopartículas de prata (AgNp).....154

1	Introdução.....	154
2	Material e Métodos.....	154
2.1	Diagnóstico microbiológico – Identificação dos microrganismos.....	155
2.2	Inoculação e mastite experimental.....	155
2.3	Avaliação clínica.....	155
2.4	Imagens termográficas.....	156
2.5	Tratamento com AgNp.....	157
2.6	Detecção dos resíduos de AgNp no leite das vacas tratadas com AgNp.....	158
2.7	Eutanásia e coleta de fragmentos de necropsia das vacas tratadas com AgNp.....	158

2.8	Análise estatística	159
3	Resultados.....	159
3.1	Diagnóstico microbiológico – Identificação dos microrganismos	159
3.2	Inoculação e mastite experimental	160
3.2.1	Avaliação clínica.....	160
3.2.2	Análises microbiológicas	160
3.2.3	Análises da CCS.....	160
3.2.4	Imagens termográficas	161
3.2.5	Tratamento com AgNp.....	162
3.2.6	Detecção dos resíduos de Ag no leite das vacas tratadas com AgNp	163
3.2.7	Eutanásia e coleta de fragmentos de necrópsia das vacas tratadas com AgNp 164	
3.2.7.1	Leitura de amostras em ICP – OES de músculo, rim e fígado das vacas tratadas com AgNp.....	164
4	Discussão.....	165
5	Conclusão.....	170
6	Referências Bibliográficas	171
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	177
7	ANEXOS.....	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.....	37
Tabela 2 - Classificação dos ensaios segundo sua finalidade.	38
Tabela 3 - Parâmetros que devem ser estudados na validação do procedimento analítico, de acordo com sua finalidade e categoria.....	38
Tabela 4 - Coeficiente máximo admitido, de acordo com a concentração do analito.	40
Tabela 5 - Faixa de Aceitação do Fator de Acurácia.	42
Tabela 6 - Recomendação de comprimentos de onda e limites estimados de detecção.	43
Tabela 7 - Volume de cada um dos componentes da solução de incubação das Células MAC–T.	75
Tabela 8 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de rebanhos leiteiros de MG, em caldo MH com AgNp de 100 nm sem PVP, em concentrações variando de 0,5 a 128 µg/mL na primeira etapa de testes com dez repetições.	79
Tabela 9 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de rebanhos leiteiros de MG, em caldo MH com AgNp de 100 nm sem PVP em concentrações variando de 0,5 a 128 µg/mL na segunda etapa de teste com dez repetições.	80
Tabela 10 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de rebanhos leiteiros de MG, em caldo MH com AgNP de 100 nm com PVP em concentrações variando de 1,5 a 10 mg/mL na terceira etapa de teste com dez repetições.	81
Tabela 11 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de rebanhos leiteiros de MG, em ágar BHI e em ágar MH contendo AgNp de 100 nm sem PVP nas concentrações de 5 e 10 mg/mL nos testes preliminares.	83
Tabela 12 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de rebanhos leiteiros de MG, em ágar BHI com AgNp de 100 nm sem PVP em concentrações variando de 5 a 15,0 mg/mL na primeira etapa de testes.	84
Tabela 13 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de rebanhos leiteiros de MG em ágar BHI com AgNp de 100 nm com PVP em concentrações variando de 1,0 a 7,0 mg/mL na segunda etapa de testes.....	85
Tabela 14 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de rebanhos leiteiros de MG em ágar BHI com AgNp de 100 nm com PVP variando de 1,5 a 3,5 mg/mL na terceira etapa de testes.....	86
Tabela 15 - Crescimento de diferentes amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de rebanhos leiteiros de MG, em ágar MH com AgNp de 100 nm com PVP em concentrações variando de 1,0 a 7,0 mg/mL.....	88

Tabela 16 - Resultado da análise do leite utilizado na determinação da precisão do equipamento, realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.	105
Tabela 17 - Resultado da análise do leite utilizado na determinação da digestão do leite realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG.....	106
Tabela 18 - Leitura da intensidade do sinal (cps) em dois tipos de comprimentos de onda em digestão úmida com HNO ₃ , HNO ₃ + H ₂ O ₂ ; HNO ₃ + HCl na concentração 4,975 ppm.	108
Tabela 19 - Resultado da análise do leite utilizado na determinação da seletividade, linearidade, acurácia e robustez, realizado no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.....	109
Tabela 20 - Resultado da leitura das amostras de leite fortificadas com 49,75 ppb AgNp; 49,75 ppb AgNp + AlNp e o branco, para avaliação da seletividade e especificidade do método de validação de AgNp em leite.	110
Tabela 21 - Resultado da análise de variância e do teste SNK comparando a média dos sinais (cps) entre amostras de leite fortificado com 49,75 ppb de AgNp; 49,75 ppb de AgNp + AlNp e branco analisadas em equipamento de ICP OES.	110
Tabela 22 - Leitura dos sinais (cps) de seis pontos utilizados para construção da curva de calibração para o leite realizada em ICP OES.	112
Tabela 23 - Resultado da análise de regressão para Linearidade de amostras de leite fortificadas com diferentes concentrações de AgNp.	113
Tabela 24 - Teste de Levene para verificação da normalidade dos dados de amostras de leite fortificadas com AgNp nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75 e 99,5 ppb.....	114
Tabela 25 - Leitura das concentrações de 4,98; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão, em amostras de leite no primeiro dia de análise.	115
Tabela 26 - Leitura das concentrações de 4,98; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão, em amostras de leite no segundo dia de análise.....	116
Tabela 27 - Recuperação percentual das concentrações de AgNp (ppb) em amostras de leite após leitura em equipamento de ICP OES.	117
Tabela 28 - Leitura da intensidade do sinal (cps) do leite analisado com diferentes efeitos na metodologia com variações na forma de armazenamento, no tempo de pré-digestão, no tempo de digestão e no volume da amostra.....	118
Tabela 29 - Procedimento de Youden para amostras de leite com variações na forma de armazenamento, no tempo de pré-digestão, no tempo de digestão ácida e no volume da amostra.	118

Tabela 30 - Análise dos efeitos gerados pelas variações do método em amostras de leite com variações na forma de armazenamento, no tempo de pré-digestão, no tempo de digestão ácida e no volume da amostra.	118
Tabela 31 - Resultado da análise para comparação entre leites com diferentes concentrações de sólidos realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.	119
Tabela 32 - Resultado da análise do leite utilizado na construção da curva para leitura das amostras de leite coletadas em São Paulo, realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora - MG.	120
Tabela 33 - Detecção de Ag (ppb) analisadas por ICP OES em amostras de leite integral embalado em garrafas de polietileno com AgNp comercializadas no Estado de São Paulo.	121
Tabela 34 - Resultados da concentração de AgNp encontrada em análise por ICP OES em amostras de leite desnatado embalado em garrafas de polietileno com AgNp comercializadas no Estado de São Paulo.	122
Tabela 35 - Resultados da concentração de AgNp encontrada em análise por ICP OES em garrafas de polietileno com AgNp comercializadas no Estado de São Paulo.	122
Tabela 36 - Composição de sólidos das amostras de músculo, rim e fígado bovino, realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG,.....	135
Tabela 37 - Resultado da leitura das amostras de músculo bovino, rim e fígado bovino fortificadas com 49,75 ppb de AgNp e 49,75 ppb de AgNp + AlNp para avaliação da seletividade e especificidade do método de digestão ácida e análise em ICP OES	136
Tabela 38 - Média dos sinais (cps) entre amostras de músculo bovino tratado com AgNp e AgNp + AlNp	136
Tabela 39 - Média dos sinais (cps) entre amostras de rim bovino tratado com AgNp e AgNp + AlNp	136
Tabela 40 - Média dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino tratado com AgNp e AgNp + AlNp	137
Tabela 41 - Leitura da média do sinal (cps) de sete pontos utilizados para construção da curva de calibração em ICP OES para as amostras de músculo bovino	137
Tabela 42 - Leitura da média do sinal (cps) de sete pontos utilizados para construção da curva de calibração em ICP OES para amostras de rim bovino	138
Tabela 43 - Leitura da média do sinal (cps) de sete pontos utilizados para construção da curva de calibração em ICP OES para amostras de fígado bovino	138
Tabela 44 - Regressão dos dados obtidos da leitura dos sete pontos em amostras de músculo bovino para determinação da linearidade	139

Tabela 45 - Regressão dos dados obtidos da leitura dos sete pontos em amostras de rim bovino para determinação da linearidade	139
Tabela 46 - Regressão dos dados obtidos da leitura dos sete pontos em amostras de fígado bovino para determinação da linearidade	140
Tabela 47 - Teste de homocedasticidade das variáveis da intensidade do sinal (cps) em amostras de músculo bovino fortificadas com diferentes concentrações de AgNp.....	141
Tabela 48 - Teste de homocedasticidade das variáveis da intensidade do sinal (cps) em amostras de rim bovino fortificadas com diferentes concentrações de AgNp.....	141
Tabela 49 - Teste de homocedasticidade das variáveis da intensidade do sinal (cps) em amostras de fígado bovino fortificadas com diferentes concentrações de AgNp	141
Tabela 50 - Leitura do sinal (cps) das concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão para amostras de músculo bovino no primeiro e segundo dia	142
Tabela 51 - Leitura do sinal (cps) das concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão para amostras de rim bovino no primeiro e segundo dia.....	143
Tabela 52 - Leitura do sinal (cps) das concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão para amostras de fígado bovino no primeiro e segundo dia	144
Tabela 53 - Recuperação percentual das concentrações de AgNp (ppb) em amostras de músculo, rim e fígado bovino após leitura em equipamento de ICP OES.....	146
Tabela 54 - Média da leitura dos sinais (cps) das amostras de músculo bovino na concentração de 49,75 ppb entre bloco digestor, tempo de pré-digestão e tipo de armazenamento	147
Tabela 55 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de rim bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre os tempos de pré-digestão (6 h e 12 h).....	147
Tabela 56 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de rim bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre as formas de armazenamento (congeladas/resfriadas).....	147
Tabela 57 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre os tempos de pré-digestão (6 h e 12 h)	148
Tabela 58 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre as formas de armazenamento (congeladas/resfriadas).....	148
Tabela 59 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino com 49,75 ppb para a variação entre as formas de armazenamento (congeladas/resfriadas) e tempo de pré-digestão (6 h e 12 h)	148
Tabela 60 - Concentração da suspensão de AgNp para cada uma das seis vacas tratadas contra mastite por <i>S. aureus</i>	157

Tabela 61 - Descrição do cronograma com as etapas de inoculação, avaliação clínica e tratamento das vacas com AgNp.....	158
Tabela 62 - Resultados das análises microbiológicas de três coletas realizadas com intervalo de uma semana em todos os quartos mamários dos seis animais do experimento pré-inoculação.	159
Tabela 63 - Resultado das amostras de CCS coletadas pré-inoculação, pós-inoculação com amostra de <i>S. aureus</i> e pós-tratamento com AgNp em números absolutos e em Log de base 10	161
Tabela 64 - Presença de alterações no leite durante avaliação com a caneca de fundo escuro no quinto dia após o tratamento com AgNp	163
Tabela 65 - Concentração de prata em leite de vacas com mastite, tratadas com AgNp na concentração de 2,5 mg/ L leite produzido. Tempo de coleta: 24; 48; 72; 96; e 120h após o tratamento	164
Tabela 66 - Resíduos de prata em músculo, rim e fígado de vacas com mastite e tratadas com AgNp na concentração de 2,5 mg/L de leite produzido. Tempo de coleta: 120h após o tratamento.	165

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas de interação das AgNp com as bactérias.	25
Figura 2 – Formação de ERO e interrupção da funcionalidade da membrana pelas AgNp.	26
Figura 3 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos das AgNp que causam citotoxicidade induzida. Os círculos vermelhos são as AgNp.	27
Figura 4 - Diferentes maneiras de ação da Ag na célula bacteriana.	31
Figura 5 - Distribuição de tamanho das AgNp obtidas por espalhamento de luz dinâmico das AgNp em caldo Mueller Hinton com a concentração de 9 mg/mL, após diferentes tempos de sonicação.	76
Figura 6 - Distribuição de tamanho das AgNp obtida por espalhamento de luz dinâmico das AgNp em caldo Mueller Hinton com diferentes concentrações.	76
Figura 7 - Distribuição de tamanho das AgNp obtida por espalhamento de luz dinâmico das AgNp sem ou com PVP em uma mistura de água deionizada por osmose reversa e álcool isopropílico.	77
Figura 8 - Curva do potencial Zeta para suspensões de AgNp sem PVP.	78
Figura 9 - Imagem de microscopia de força atômica de uma suspensão de AgNp sem PVP, em uma mistura de água e álcool isopropílico.	78
Figura 10 - Imagem de microscopia de força atômica de uma suspensão de AgNp com PVP, em uma mistura de água e álcool isopropílico.	78
Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura de AgNp sem PVP.	79
Figura 12 - Precipitação das AgNp sem PVP em caldo MH.	82
Figura 13 - Precipitação das AgNP com PVP em caldo MH.	82
Figura 14 - Tubo Falcon de 15 mL com AgNp em ágar BHI.	83
Figura 15 - Placa com células MAC–T impregnadas com AgNp na concentração de 500 mcg/mL.	89
Figura 16 - Células MAC - T impregnadas com AgNp na concentração de 500 mcg/mL.	89
Figura 17 - Células MAC – T coradas com Azul de Tripán na concentração de 250 mcg/mL.	90
Figura 18 - Células MAC-T coradas com azul de Tripán na concentração de 500 mcg/ mL.	90
Figura 19 - Células MAC-T coradas com azul de Tripán na concentração de 750 mcg/ mL.	91

Figura 20 - Fluxograma de preparo das amostras de leite da coleta até a suspensão das NP em soro + leite.	100
Figura 21 - Fluxograma das amostras de leite da secagem até o armazenamento.....	101
Figura 22 - Resultado da regressão com uma reta de seis pontos para determinação da Linearidade nas amostras de leite fortificadas com AgNp nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.	113
Figura 23 - Gráfico da Linearidade em função do sinal gerado pela leitura em equipamento de ICP OES em amostras de leite fortificadas com AgNp nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75 e 99,5 ppb.	114
Figura 24 - Respostas da Leitura do ICPOES ao efeito de diferentes metodologias.....	119
Figura 25 - Curva utilizada para leitura do leite envasado em garrafas de polietileno acrescentadas com AgNp, comercializado no estado de São Paulo.	121
Figura 26 - Fluxograma da distribuição das amostras de músculo bovino para robustez.	133
Figura 27 - Fluxograma da distribuição das amostras de rim e fígado bovino para robustez. .	134
Figura 28 - Resultado da regressão com uma reta de sete pontos para determinação da Linearidade nas amostras de músculo bovino fortificadas com Ag Np nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75; 74,63 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.....	139
Figura 29 - Resultado da regressão com uma reta de sete pontos para determinação da Linearidade nas amostras de rim bovino fortificadas com Ag Np nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75; 74,63 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.	140
Figura 30 - Resultado da regressão com uma reta de sete pontos para determinação da Linearidade nas amostras de fígado bovino fortificadas com Ag Np nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75; 74,63 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.	140
Figura 31 - Imagens termográficas do AD antes da inoculação experimental de <i>Staphylococcus aureus</i> (amostra 619) em quartos mamários de seis vacas.....	162
Figura 32 - Imagens termográficas do AD após a inoculação experimental de <i>Staphylococcus aureus</i> (amostra 619) em quartos mamários de seis vacas.....	162

RESUMO

A mastite, principal doença dos rebanhos leiteiros, é responsável por até 40% de todas as doenças infecciosas e por significativas perdas econômicas em função da diminuição da produção, gastos com medicamentos, serviços veterinários e descarte de leite. No Brasil, o principal patógeno causador da mastite é *Staphylococcus aureus*, microrganismo de difícil controle e que apresenta resistência à maioria dos antimicrobianos utilizados na medicina veterinária. Uma nova alternativa para o seu controle baseia-se no uso da nanotecnologia, que é mais eficiente em relação aos antimicrobianos tradicionais, com doses muito mais baixas, diminuindo com isto, os riscos de resíduos no leite e nos tecidos de animais tratados. Neste sentido, o trabalho teve três objetivos. O primeiro objetivo foi a determinação da MIC para *S. aureus* com AgNp comerciais de 100 nm. Para tal, utilizaram-se 23 amostras de *S. aureus* isoladas no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora – MG, e fez-se a avaliação em placas de Ágar BHI com diferentes concentrações de AgNp. O resultado da MIC demonstrou que a dose mínima foi de 2,5 mg/mL e que a metodologia tradicional, sugerida pelo CLSI, com uso do caldo MH, não funcionou para a MIC com AgNp. O segundo objetivo do trabalho foi validar uma metodologia para detecção de Ag no leite e em tecidos biológicos (músculo, rim e fígado bovino). As amostras de leite e tecidos, coletadas de animais negativos para resíduos de Ag, foram fortificadas com dosagens conhecidas de AgNp. Após secagem em estufa, as mesmas foram submetidas a digestão e abertura com HNO₃ na pré-digestão, associadas ao HCl durante o processo de aquecimento em bloco digestor. A leitura das amostras foi realizada em equipamento de ICP – OES. Os resultados demonstram que o método de digestão proposto gera um ótimo sinal, com um desvio padrão menor do que 2%. A técnica de digestão e leitura das amostras é muito eficiente e com sensibilidade testada de no mínimo 0,4975 ppb. A precisão do equipamento foi maior entre 4,98 e 49,75 ppb para detecção de Ag. Os critérios exigidos pela legislação, como Linearidade, Seletividade, Acurácia, Precisão, Limite de Detecção e Limite de Quantificação foram atendidos para todas as matrizes avaliadas. Porém, o método se mostrou robusto apenas para leite e músculo bovino. Em relação ao rim e fígado bovino, o método se mostrou sensível a algumas mudanças na metodologia padrão. O terceiro objetivo do trabalho foi de induzir mastite em seis vacas, com uma das 23 amostras de *S. aureus* utilizadas na MIC (amostra 619) e, em seguida, tratar com AgNp, na dose estipulada pela MIC. Após o tratamento, foi coletado leite por cinco dias e, no quinto dia, foi efetuada eutanásia das vacas, para coleta de amostras para verificação da presença de resíduos de Ag. Os resultados demonstraram que a aplicação intra-mamária das AgNp nas vacas, resultou em 50% de cura clínica, avaliada pela presença de grumos durante a ordenha e exames clínicos. No entanto, análises microbiológicas do leite demonstraram que não houve cura microbiológica em 100% dos quartos tratados. Em relação à presença de resíduos, após o quinto dia de tratamento, foi detectada uma concentração alta de Ag no leite do quarto mamário tratado (PE) e no fígado dos seis animais. No geral, a metodologia proposta foi eficiente e o ICP – OES, demonstra ser uma ótima opção para determinação de Ag em matrizes biológicas. Porém, as AgNp comerciais de 100 nm não foram eficazes para controle e tratamento da mastite por *S. aureus*.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, mastite, *S. aureus*, validação, ICP – OES

ABSTRACT

Mastitis, the main disease of dairy herds, is responsible for up to 40% of all infectious diseases and significant economic losses due to decreased production, spending on medicines, veterinary services and milk disposal. In Brazil, the main pathogen that causes mastitis is *Staphylococcus aureus*, a microorganism that is difficult to control and resistant to most antimicrobials used in veterinary medicine. A new alternative to its control is based on the use of nanotechnology, which is more efficient than traditional antimicrobials, at much lower doses, thereby reducing the risks of residues in the milk and tissues of treated animals. In this sense, the work had three objectives. The first objective was the determination of MIC for *S. aureus* with commercial AgNp of 100 nm. For this, 23 samples of *S. aureus* were isolated at the Milk Microbiology Laboratory of Embrapa Dairy Cattle, in Juiz de Fora, MG, and evaluated on BHI Agar plates with different concentrations of AgNp. The MIC results showed that the minimum dose was 2.5 mg/mL, and that the traditional methodology suggested by the CLSI, using the MH broth, did not work for the MIC with AgNp. The second objective of the study was to validate a methodology for the detection of Ag in milk and in biological tissues (muscle, kidney and bovine liver). Milk and tissue samples, collected from animals negative for Ag residues, were fortified with known AgNp dosages. After drying in greenhouse, they were submitted to digestion and opening with HNO₃ in the pre-digestion, associated to HCl during the heating process in a digester block. The samples were read on ICP - OES equipment. The results demonstrated that the proposed digestion method generates a good signal, with a standard deviation of less than 2%. The technique of digestion and reading of the samples is very efficient and with a tested sensitivity of at least 0.4975 ppb. The accuracy of the equipment is higher between 4.98 and 49.75 ppb for Ag detection. The criteria required by the legislation, such as Linearity, Selectivity, Accuracy, Detection Limit and Quantification Limit were met for all matrices evaluated. However, the method proved to be robust only for milk and bovine muscle. In relation to kidney and bovine liver, the method was sensitive to some changes in the standard methodology. The third objective of the study was to induce mastitis in six cows with one of the 23 *S. aureus* samples used in the MIC (sample 619) and then treated with AgNp at the dose determined by MIC. After the treatment, milk was collected for five days, and on the fifth day cow euthanasia was performed to collect samples to verify the presence of Ag residues. The results showed that intramammary application of AgNp in cows resulted in 50% clinical cure, evaluated by the presence of lumps during milking and clinical examinations. However, microbiological analyzes of the milk showed that there was no microbiological cure in 100% of the treated rooms. Regarding the presence of residues, after the fifth day of treatment, a high concentration of Ag was detected in the milk of the fourth treated mammary (PE) and in the liver of the six animals. In general, the proposed methodology was efficient and ICP-OES, a great option for determination of Ag in biological matrices. However, commercial 100 nm AgNPs were not effective for the control and treatment of *S. aureus* mastitis.

Keywords: Silver nanoparticles, mastitis, *S. aureus*, validation, ICP-OES.

1 INTRODUÇÃO

A mastite, principal doença dos rebanhos leiteiros, é responsável por até 40% de todas as doenças infecciosas e por importantes perdas econômicas em função da diminuição da produção, gastos com medicamentos, serviços veterinários e descarte de leite. Por se tratar de patologia difícil de ser erradicada dos rebanhos, a melhor maneira de evitar a doença é por meio da prevenção. Entretanto, somente a prevenção não é suficiente e, mesmo assim, ocorrem casos clínicos e subclínicos da doença, sendo necessário também, o tratamento. Tanto no controle preventivo, quanto no tratamento dos casos clínicos e subclínicos é comum o uso de antimicrobianos, que na maioria dos casos são usados de forma inadequada e sem controle, o que gera amostras resistentes, devido a uma pressão de seleção.

Nos últimos anos, há várias discussões sobre o uso indiscriminado de medicamentos na produção animal, principalmente nos países europeus, onde os órgãos fiscalizadores têm sugerido diminuição do uso de medicamentos em animais de produção, principalmente antimicrobianos.

A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos é uma ameaça real para a saúde pública, levando a infecções, aumento da morbidade, mortalidade e custos para o sistema de saúde. A principal causa do problema é o uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal e em humanos. Aproximadamente 80% dos antimicrobianos vendidos nos Estados Unidos em 2012 foram destinados para uso em animais e, aproximadamente, 60% desses agentes são considerados importantes para a medicina humana. O fato é que agentes antimicrobianos utilizados na produção animal podem contribuir para o desenvolvimento da resistência (Paulson e Zaoutis, 2015).

Da mesma forma, Yah et al. (2017) relataram que a resistência a múltiplas drogas é um problema crescente no tratamento de doenças infecciosas e o uso generalizado de antimicrobianos de amplo espectro resulta no desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos em humanos e em animais. O resultado foi um grande número de microrganismos resistentes causando perdas econômicas na produção leiteira.

Dados recentes mostram que o consumo de antimicrobianos no mundo aumentará 67% até 2030. Nos Estados Unidos, são usadas anualmente 3,4 mil toneladas destas substâncias em pacientes e 8,9 mil toneladas em animais de produção (BBC, 2015).

A indústria farmacêutica veterinária cresce de forma alarmante. No Brasil, o faturamento da indústria farmacêutica veterinária foi de R\$ 4,9 bilhões em 2015 e R\$ 5,0 bilhões em 2016, sendo que os antimicrobianos representaram 14% deste mercado. No mundo, o mercado foi de US\$ 23,9 bilhões em 2016, sendo 47% nas Américas (SINDAN, 2017).

Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos, econômicos e eficientes que diminuam o uso dos medicamentos tradicionais e o risco de resíduos. O mercado necessita de novos compostos, mais eficientes e com menores dosagens, principalmente para o controle de doenças como a mastite, em que o tratamento se fundamenta no uso de antimicrobianos convencionais diretamente na glândula mamária.

Os fármacos convencionais, na sua forma livre, como eles são administrados em formulações comerciais na ocorrência da mastite, requerem administrações múltiplas para alcançar níveis com

elevadas concentrações em vários tecidos, causando variações no nível de plasma que levam a toxicidade ou ao desenvolvimento de resistência microbiana (Mosqueira et al., 2013).

Uma alternativa recente para diminuir o uso de antimicrobianos, principalmente nos casos de mastite em vacas leiteiras, é o uso de compostos nanoestruturados, como alguns antimicrobianos e formulações como as nanopartículas de prata (AgNp). A Ag possui uma gama de aplicações e as AgNp têm grande potencial inibitório e efeito bactericida, além de retardar o crescimento de fungos (Chen e Schluesener, 2008).

O uso crescente destes compostos pode ser útil. Porém, não há estudos conclusivos sobre a resistência dos microrganismos e nem sobre a eficácia das AgNp no controle da mastite. Não se sabe ainda a melhor forma de administração, a dose ideal, o período de carência e a biodistribuição do fármaco no úbere da vaca. Também, ainda não existe metodologia validada para detecção de Ag em leite, em tecidos de animais tratados e nos produtos embalados utilizando esta tecnologia. Isso se faz necessário, visto que já existe no mercado produtos contendo Ag que podem, no futuro, serem utilizados para controle de doenças nos animais, entre estas a mastite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite

2.1.1 Etiologia

A mastite é definida como inflamação da glândula mamária que ocorre em resposta a uma infecção bacteriana intramamária, por micoplasmas, fungos ou infecções por algas. Traumas mecânicos, trauma térmico e injúria química predispõe a glândula à infecção intramamária (IIM). A ocorrência de mastite depende da interação entre agente, animal e fatores ambientais (Zhao e Lacasse, 2014). De acordo com a intensidade do processo inflamatório, a mastite é classificada como clínica ou subclínica.

A infecção pode ser causada por mais de 140 diferentes microrganismos (Philpot e Nickerson, 2002). No Brasil, *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador da mastite nos rebanhos (Costa, 2008; Lange et al., 2011). Lamaita et al. (2005) isolaram *Staphylococcus* spp. em 100% de amostras de leite de tanques refrigeradores de propriedades de Minas Gerais. *S. aureus* foi observado em 34,6% das espécies isoladas.

2.1.2 Impacto econômico

O custo da mastite é muito alto, pois a ocorrência de casos clínicos e a alta prevalência de infecções subclínicas levam a perdas econômicas para o produtor e para a indústria, ocasionando redução da quantidade e da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (Philpot e Nickerson, 2002; Ruegg, 2003; Braem et al., 2013). Além de gastos com medicamentos, há grande perda por descarte do leite e por reposição de animais (Costa et al., 2011).

Nos Estados Unidos, a doença tem um custo anual de US \$ 1,8 bilhão. Isso é aproximadamente 10% do valor total da venda de leite das fazendas. Dois terços dessa perda ocorrem devido à redução da produção de leite em vacas com infecção subclínica. A perda durante uma lactação de um quarto infectado é cerca de 725 Kg de leite. Demais perdas ocorrem por descarte de leite em animais em tratamento, descarte involuntário, redução do valor de vacas infectadas, custos com medicamentos e serviços veterinários (Schroeder, 2012).

Um grande estudo realizado na maior região produtora de leite da Argentina demonstrou uma perda média pela mastite subclínica de 2,8 litros/vaca/dia, ocasionando um custo de US\$ 0,99/vaca/dia. A perda média devido a casos de mastite clínica foi de 0,12 litros/vaca/dia, representando um custo de US\$ 0,04/vaca/dia (Vassio et al., 2015).

Machado et al. (2000) relataram que levantamentos realizados em várias regiões no Brasil, a partir de 1992, apresentaram índices variando de 14,4% a 97% de vacas infectadas por rebanho. *S. aureus* foi um dos principais agentes causadores de mastite em vacas leiteiras, com taxas que variaram de 8,3% e 49,23% de ocorrência nos rebanhos brasileiros (Brito et al., 1999; Costa et al., 2013).

De acordo com Costa et al. (2001), a ocorrência de mastite subclínica e clínica foram, respectivamente, de 72% e 14,53%, nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Costa et al.

(2008) realizaram um estudo com 35 rebanhos do sul de Minas Gerais e relataram índices médios de 52,2 % de mastite subclínica e 9,87% de mastite clínica. Mello et al. (2012) identificaram uma variação de 70,5 a 81,9% de mastite subclínica em 21 propriedades da região Sudoeste do Paraná.

Lopes et al. (2012) conduziram uma pesquisa por meio de simulação de dados brasileiros, utilizando o sistema computacional “custo mastite” com vacas com produção média de 20 Kg/dia e verificaram um impacto econômico/vaca em lactação/ano de R\$ 727,85, R\$ 1.604,82 e R\$ 2.774,11 em função da frequência média anual de mastite clínica em 1%, 7% e 15%, respectivamente. Os resultados demonstram grandes perdas e a necessidade de adoção de medidas preventivas que representam 19,7% do impacto econômico, demonstrando as vantagens de investir na prevenção e controle da mastite.

Os prejuízos causados pela mastite ambiental são estimados em R\$ 200,00 por caso clínico, sendo que cerca de 90% desse custo ocorrem por redução da produção de leite (cerca de 450 kg/caso) e descarte do leite (cerca de 260 kg/caso) (Santos, 2012).

2.1.3 Tratamentos convencionais

O método de administração de agentes antimicrobianos pela via intramamária para o tratamento de mastite clínica ou subclínica é o preferido pelos produtores, permitindo aplicações de pequenas quantidades de agentes antimicrobianos diretamente no local da infecção (Tozzetti et al., 2008). Porém, aplicações parenterais associadas a infusão local também são utilizadas (Gruet et al., 2001).

Tratamento com antimicrobiano na mastite clínica é utilizado para a redução da gravidade e em algumas instâncias para a eliminação da infecção. De qualquer modo, tratamento de mastite clínica não significa redução da prevalência de mastite, a menos que ela seja acompanhada de outros bons programas de controle de mastite. Um fator limitante é que somente cerca de 40% das infecções tornam-se clínicas e podem ser detectadas durante a lactação, com uma aparência de anormalidade no leite e no úbere (NMC, 1987).

Os antimicrobianos são úteis na cura das vacas com infecções, podem salvar a vida de algumas vacas e evitam infecções durante o período de secagem. A principal preocupação da maioria dos produtores de leite é como fazer o melhor uso dos antimicrobianos e de outros medicamentos para tratar os casos clínicos durante a lactação. Esses casos exigem a ação imediata e a avaliação individual de cada caso (Philpot e Nickerson, 2002).

Porém, a cura microbiológica nem sempre ocorre. *Staphylococcus aureus*, uma das principais bactérias causadoras de mastite, pode formar abscessos encapsulados em porções superiores do úbere, desenvolvendo uma forma subclínica, o que dificulta a cura bacteriológica durante lactação. A redução na taxa de cura durante a lactação ocorre porque os antimicrobianos usados são de meia-vida curta, permanecendo em níveis terapêuticos por tempo insuficiente para determinar completa eliminação da forma cística. Neste caso, se não houver tratamento, durante a secagem, estas bactérias podem resistir à totalidade do período seco e retornar na lactação seguinte. Em média, é possível eliminar 90 % das infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* e 70 % por *Staphylococcus aureus* com o tratamento no período seco (Naztke, 1971). No entanto, a eficácia pode ser aumentada se houver retenção das drogas nos locais de infecção.

Outro fator importante é que alguns agentes antimicrobianos convencionais não conseguem atravessar determinadas membranas celulares, tornando-os ineficazes para o tratamento de agentes patogênicos intracelulares (Yah e Simate, 2015). Portanto, existe uma necessidade de superar as limitações de antimicrobianos convencionais. Recentemente, os avanços na nanotecnologia levaram ao desenvolvimento de nanopartículas (NP) com propriedades físico-químicas únicas que são capazes de superar várias restrições em relação aos agentes antimicrobianos convencionais (Yah e Simate, 2015; Gurunathan, 2015).

Neste contexto, o desenvolvimento de uma formulação antimicrobiana para o tratamento da mastite deverá possuir características como facilidade de penetração em células fagocitárias, manutenção da atividade do antimicrobiano nos lisossomas dos fagócitos, cujo meio é ácido, possibilidade de administração via intramamária sem acarretar perda da atividade ou degradação do antimicrobiano e liberação no local de ação (Craven e Anderson, 1984).

2.2 Nanotecnologia

2.2.1 Aplicabilidade de nanopartículas na Medicina Veterinária

O uso da nanotecnologia em medicamentos é uma área promissora para o tratamento de infecções em humanos e animais (Barratt, 2003). Medicamentos utilizando a nanotecnologia já estão sendo utilizados em tratamentos de humanos e surge como mais uma forma de tratamento da mastite bovina. Estes novos produtos protegem o medicamento contra a degradação, são rapidamente capturados por células do sistema mononuclear fagocitário e podem ser administradas por várias vias, com aumento da seletividade pelo local de ação (Vila et al., 2002).

Alguns produtos já foram desenvolvidos no Brasil com o uso da nanotecnologia para tratamentos específicos de bovinos leiteiros, como os produtos à base de cloxacilina benzatina e intramamária para tratamento da mastite (Castanheira, 2012; Mosqueira et al., 2013).

2.2.2 Prata em forma de nanopartículas

A Ag tem sido utilizada desde tempos imemoriais, sob a forma de prata metálica, de nitrato de prata, sulfadiazina de prata, para o tratamento de queimaduras, feridas e várias infecções bacterianas. Devido ao surgimento de vários antimicrobianos, o uso desses compostos de Ag, no entanto, foi diminuindo. A nanotecnologia está ganhando grande impulso no século presente, devido à sua capacidade de modular os metais em seu tamanho nanométrico, que muda drasticamente as propriedades químicas, físicas e ópticas dos metais. Prata metálica na forma de AgNp teve um retorno notável como um potencial agente antimicrobiano. O uso das AgNp também é importante, pois várias bactérias patogênicas desenvolveram resistência contra diversos antimicrobianos convencionais. Assim, as AgNp surgiram com diversas aplicações médicas que vão desde curativos à base de Ag, dispositivos medicinais revestidos de Ag, como nanogéis, nanolotions, entre outros (Rai et al., 2009).

Apesar das mudanças na nomenclatura através de décadas, houve muita confusão entre os cientistas e até entre os fabricantes. É inegável que os produtos contendo partículas de Ag em nanoescala estão disponíveis comercialmente há mais de 100 anos e foram usadas em aplicações diversas como pigmentos, fotografias, tratamento de feridas, compostos condutores,

catalisadores, ou como biocida. Com esta história longa e diversificada de uso, é claro que diversas pesquisas sobre a química de Ag em nanoescala foram conduzidas ao longo dos últimos 120 anos. Na maioria dos estudos, até muito recentemente, não se usava a nomenclatura "nano". Porém, vários produtos à base de Ag com tamanho menor que 100 nm foram registrados nos EUA (EPA) desde a década de 50. O aparecimento do nome de nano surgiu a partir da década de 90 (Nowack et al., 2011).

Nos últimos anos, diversos produtos usando Ag, seja na forma metálica ou iônica, administrada de forma tópica, como agente bacteriano têm sido lançados no mercado e vêm ganhando popularidade diante da propagação de bactérias como *S. aureus* resistentes a antimicrobianos. Porém, pesquisas mostram que as AgNp, na forma de solução coloidal, apresentaram relevante atividade antimicrobiana com uma menor toxicidade quando comparada à prata iônica (Santana, 2012).

Devido ao baixo custo e sua ampla atividade bacteriana, a aplicação das AgNp tem sido realizada em aproximadamente 70% dos produtos na área da saúde e em cosméticos. Os 30% restantes têm sido aplicados produtos na área têxtil, alimentos e bebidas, eletrônicos, produtos domésticos e embalagens (Silver, 2003; Lem et al., 2012).

As AgNp possuem várias aplicações e já existem vários produtos de consumo na forma de Np. O banco de dados de Woodrow Wilson listou 1.015 produtos de consumo onde são incorporadas Np, sendo que 259 apresentam AgNp. O número de produtos contendo AgNp cresceu de menos de 30 em 2006 para mais de 300 no início de 2011 (Wwics, 2011). Estima-se que cerca de 280 toneladas de AgNp foram produzidas para utilização em produtos comerciais ou industriais, e os dados sugeriam que esse número deveria quadruplicar em 2015 (The Silver Institute, 2011). Gottschalk et al. (2010) relataram a produção de 320 mil toneladas/ano em 2010. Previsões indicavam que em 2014, os nanomateriais seriam incorporados em 15% dos produtos de fabricação global, representando um impacto econômico de US \$ 2,6 trilhões (Instituto Nacional de Trabalho Segurança e Saúde (NIOSH, 2009).

Alguns trabalhos para uso específico em produtos veterinários para controle da mastite já foram publicados. Wernicki et al. (2014) realizaram uma pesquisa com o objetivo de determinar as propriedades antimicrobianas de AgNp, nanopartículas de ouro (AuNp), cobre (CuNp) e platina (PtNp) em relação a agentes patogênicos isolados de casos de mastite em bovinos por *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. krusei*. Os resultados obtidos mostram que as AgNp e CuNp tiveram efeito inibitório mais forte sobre o crescimento dos microrganismos testados, com a concentração $\geq 6,25$ ppm para AgNp e 12,5 ppm para CuNp. O efeito das AuNp e PtNp eram mais fracas e os valores de inibição, mais altos.

Dehkordi et al. (2011) fizeram uma avaliação *in vitro* do efeito antibacteriano de AgNp em *S. aureus* isolados de mastite subclínica bovina. Os resultados mostram um MIC entre 1,25 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

Da mesma forma, Gavilanes (2010) relatou que o uso das AgNp *in vitro* em concentração de sete ppm reduziu o crescimento no leite de vacas com mastite subclínica. Para *S. aureus*, a redução foi de 92,1% em 60 min. *S. epidermidis* foi reduzido em 98,9% em um tempo de 30 min.; *E. coli* foi reduzido em 99,4% em 30 min. e *Bacillus* sp. foi reduzido em 99,3%, em 30 min. *In vivo*, a aplicação das AgNp (7 ppm) em sete bovinos leiteiros com mastite subclínica, levou, após o

quinto dia, a uma redução com 76,9% de resultado positivo, 15,4% de traços e 7,7% de negativo. Em dois animais houve ausência de mastite subclínica no terceiro dia após o tratamento.

Em ratos de laboratório infectados experimentalmente com *S. aureus*, Kumar et al. (2013) inocularam Cefepima (1 mg/Kg) e uma formulação nanoestruturada sintetizada por redução de nitrato de prata com Aloína. Os autores concluíram que o uso de Aloína nanoestruturada possui um efeito anti-bacteriano, superior a Cefepima. Além disso, o composto também exibiu profundo efeito anti-inflamatório em mastite por *S. aureus*, que não foi encontrado com o tratamento antimicrobiano.

Akram et al. (2016) avaliaram a eficácia da combinação tripla de AgNPs, fototerapia e os antimicrobianos convencionais vancomicina, linezolid, amoxicilina, azitromicina e claritromicina contra isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). O resultado demonstrou eficiência significativa em combinações triplas de AgNPs, fototerapia e antimicrobiano, em comparação com tratamentos envolvendo um ou dois agentes. As atividades bactericidas foram maiores quando a azitromicina ou claritromicina foi incluído na terapia tripla em comparação com os outros antimicrobianos testados.

Com o mesmo objetivo, Jamaran e Zarif (2016) investigaram o efeito sinérgico das AgNp com neomicina ou gentamicina em *S. aureus* isolados de vacas com mastite. O resultado demonstrou que o antimicrobiano gentamicina e AgNp tiveram efeitos sinérgicos em 50% das amostras e a neomicina e AgNp tiveram efeitos sinérgicos em 45% das amostras.

Em trabalho recente, Yah et al. (2017) realizaram uma pesquisa utilizando amostras isoladas de cabras com mastite por *S. aureus* e *P. aeruginosa* e o resultado do MIC utilizando AgNp de 11 nm foi de 1 e 2 µg/mL, respectivamente, demonstrando que as AgNp têm um potencial para uso em cabras com mastite causadas por diferentes microrganismos.

A toxicidade das AgNp é um assunto bastante discutido. Testes realizados na Tailândia por Maneewattanapinyo et al. (2011) em ratos e cobaias de laboratório, utilizando soluções orais e tópicas (ocular e dérmica) não demonstraram efeitos tóxicos das AgNp. Porém, os autores relataram sobre a necessidade de mais estudos para conhecimento dos efeitos tóxicos destes compostos.

Vários estudos descrevem que o efeito tóxico é dependente do tamanho da nanopartícula. Yuan et al. (2017) relatam que o uso de AgNp de menor tamanho leva ao estresse oxidativo das células e diminui as defesas antioxidantes. Portanto, embora partículas menores sejam mais eficazes devido à maior superfície de contato, são mais tóxicas.

Outro fator importante em relação à toxicidade das AgNp, refere-se ao revestimento utilizado em alguns compostos. Tsiola et al. (2017) avaliaram o impacto do revestimento de Polietilenimina ramificada (BPEI) em relação a Polivinilpirrolidona (PVP) e o tamanho (40 nm versus 60 nm). Os resultados revelaram que AgNp com PVP causaram maior toxicidade do que AgNp com BPEI, e isso foi possivelmente relacionado à maior taxa de dissolução. Além disso, a toxicidade de AgNp com BPEI era dependente do tamanho, sendo 40 nm mais tóxicos do que 60 nm. Porém, não foi detectado diferença de toxicidade em relação ao tamanho para AgNp com PVP.

Portanto, é necessário conhecer mais sobre os mecanismos de ação dos íons de prata (Ag^+) em microrganismos, pois ainda não são totalmente conhecidos. De acordo com Kim et al. (2007), o

efeito inibitório do Ag^+ está diretamente relacionado com a atração eletrostática entre a parede celular dos microrganismos carregada negativamente e a carga positiva dos íons de Ag. Porém, há várias hipóteses sobre o real mecanismo de ação das AgNp sobre os microrganismos.

2.2.3 Mecanismos de ação das nanopartículas de prata

De acordo com Ray et al. (2009), os metais de transição são muito utilizados na produção de nanocompostos e estudados desde o século 19 por Wutrich. Já no início do século 20, o pesquisador Wober continuou as pesquisas com as propriedades químicas dos metais. Com base nestas pesquisas, Horsfall em 1956 estabeleceu a seguinte ordem de fungitoxicidade para os metais: $\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Au} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mo} > \text{Sn}$. Muitos outros metais além da Ag possuem propriedades bactericidas, como observado na escala de atividade contra microrganismos (Ray et al., 2009). Neste sentido, Oliani (2013) concluiu que a Ag dependendo da sua quantidade é o metal que apresenta a maior ação e menor toxicidade para as células animais.

Os íons Ag atacam as células microbianas de maneira complexa, atingindo vários sítios celulares, sendo o risco de seleção de bactérias resistentes menor, em comparação com os antimicrobianos (Damm et al., 2007), que geralmente exercem o seu efeito antimicrobiano em local específico (Gogoi et al., 2006).

Acredita-se que o efeito inibitório dos íons Ag^+ é devido à adsorção na parede celular carregada negativamente, desativando enzimas celulares, destruindo a permeabilidade da membrana (Percival et al., 2005) e, por último, levando à lise celular e morte (Ratte, 1999; Sambhy et al., 2006). Entretanto, o mecanismo de ação das AgNp não é bem conhecido (Morones et al., 2005).

Dakal et al. (2017) destacam que a adesão de AgNp às células microbianas, a penetração dentro das células, a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e a modulação de caminhos de transdução de sinal microbiano foram reconhecidos como os modos mais proeminentes de ação antimicrobiana (**Figura 1**).

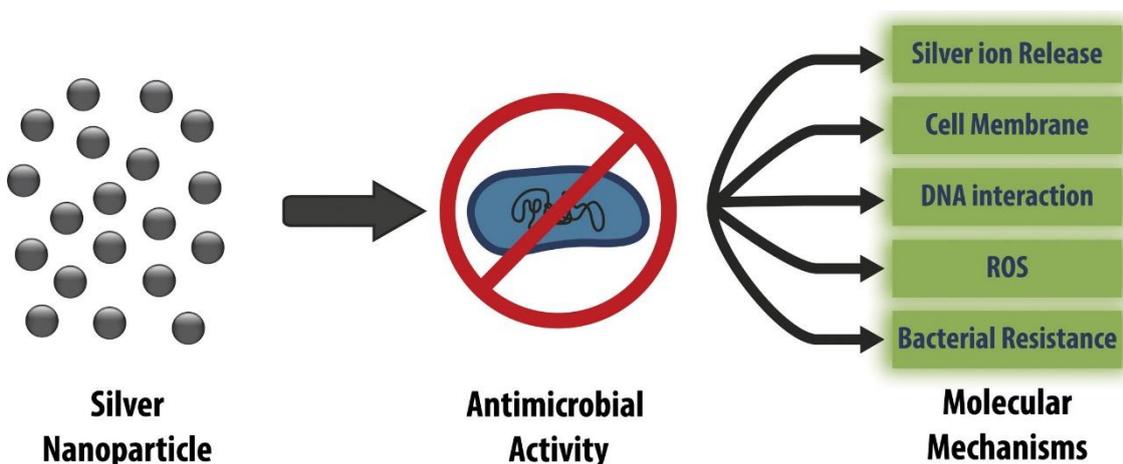


Figura 1 - Formas de interação das AgNp com as bactérias.
Fonte: Durán et al. (2015)

O verdadeiro mecanismo do efeito antibacteriano das AgNp não está completamente esclarecido. O lançamento de íons ativos de Ag e de soluções de AgNp em solução aquosa já foram relatados e a suspeita é que eles atacam a célula bacteriana de várias formas, o que provoca danos letais às células. As interações dos íons de Ag em diferentes níveis da célula bacteriana são demonstradas pelo que ocorre com os componentes da parede celular, membrana citoplasmática, DNA bacteriano, bem como proteínas e enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons (Chaloupka et al., 2010).

Marambio-Jones e Hoek (2010) descrevem que o mecanismo de ação das AgNp na célula bacteriana ocorre em três etapas: 1) Absorção de íons prata livre (Ag^+) levando à interrupção de produção de ATP e da replicação de DNA; 2) Geração de ERO que produzem estresse oxidativo; 3) Dano direto sobre a membrana celular por dissolução oxidativa (proteína da membrana e permeabilidade).

De acordo com os autores supracitados, em concentrações submicromolares, os íons de Ag são internalizados e reagem com grupos tiol de proteínas celulares, que levam a desacoplamento da síntese de ATP a partir da respiração, a perda de força motriz próton, e interferência com o sistema de efluxo de fosfato. Em níveis de mili-molares, AgNp induzem o descolamento da membrana da parede celular a partir do citoplasma, com a possível liberação do conteúdo intracelular, a condensação do DNA e perda da capacidade de replicação. As ERO produzem estresse oxidativo resultando em danos à membrana e ao DNA. Finalmente, as AgNp aumentam a permeabilidade da membrana celular e, subsequentemente, penetram dentro das células induzindo uma ou toda a cascata de efeitos acima descritos (**Figura 2**).

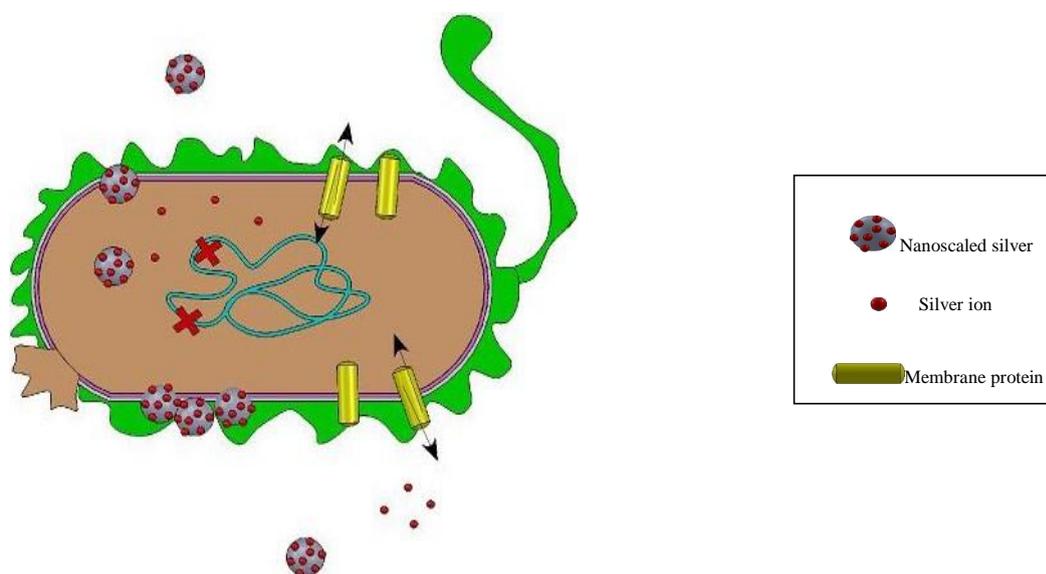


Figura 2 – Formação de ERO e interrupção da funcionalidade da membrana pelas AgNp.
Fonte: Vimbela et al. (2017)

Nota: As atividades antibacterianas da Ag são devidas à formação de ERO e à interrupção da funcionalidade da membrana. A formação de ERO causa estresse oxidativo, o que leva a danos celulares. A interação entre os íons liberados pelas AgNp resulta em ruptura da funcionalidade da membrana.

Porém, alguns trabalhos apontam para duas teorias principais sobre o mecanismo de ação da AgNp. A primeira refere-se a uma ruptura da funcionalidade da membrana a partir de uma interação entre íons Ag^+ liberados e a membrana celular e a segunda sobre danos extensivos à membrana celular causados pela formação de ERO, causando danos na célula devido ao estresse oxidativo (Figura 2) (Ivask et al., 2013).

- Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Nanopartículas com 100 nm ou menos de dimensão têm propriedades físico-químicas únicas, como alta capacidade catalítica e capacidade de gerar ERO (Limbach et al., 2007). Assim, pode haver a liberação de Ag^+ das Np dentro das células dos microrganismos, formando ERO com indução do estresse oxidativo (Wong et al., 2010).

As ERO tais como H_2O_2 , OH^\cdot , entre outras são subprodutos do metabolismo natural dos organismos. As AgNp poderiam agir como catalisadores na produção das ERO em excesso, gerando assim um estresse oxidativo na célula e provocando uma ruptura da membrana celular (Su et al., 2009).

Wei et al. (2015) demonstraram que a exposição das AgNp causa citotoxicidade, elevando as ERO e aumentam os níveis de peroxidação lipídica. Isto também leva a genotoxicidade por indução de danos no DNA cromossômico (**Figura 3**).

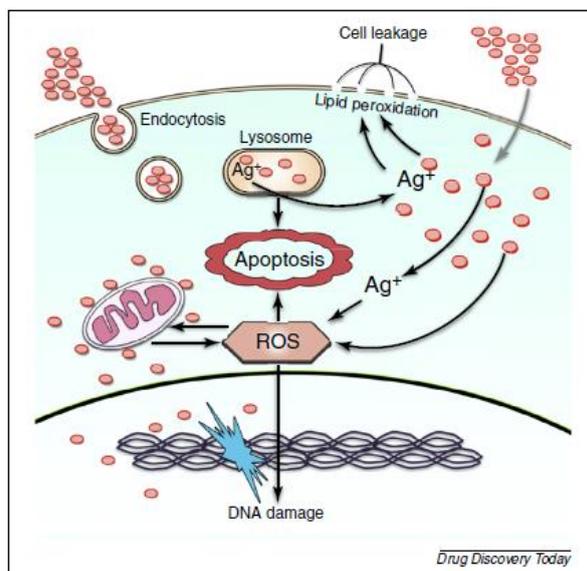


Figura 3 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos das AgNp que causam citotoxicidade induzida. Os círculos vermelhos são as AgNp.

Fonte: Wei et al. (2015)

Em trabalho recente, Yah et al. (2017) relataram que a atividade antibacteriana das AgNp é devida à geração de ERO, malondialdeído (MDA) e vazamento de proteínas e açúcares em células bacterianas. As bactérias tratadas com AgNp tinham significativamente menor atividade de lactato desidrogenase (LDH) e menores níveis de adenosina trifosfato (ATP) comparados ao controle e diminuição das principais enzimas antioxidantes.

- Interação da prata com fósforo e enxofre

Devido à presença de enxofre e fósforo nas proteínas das membranas celulares, as AgNp e os íons de Ag interagem com essas proteínas e podem inibir as funções do DNA (Wong et al., 2010).

Acredita-se que a alta afinidade da Ag pelo enxofre ou fósforo é o elemento-chave de sua propriedade antibacteriana (Lansdown, 2002). Mastsumure et al. (2003) propuseram que os íons Ag^+ , liberados das AgNp, podem interagir com o fósforo no DNA, resultando na inativação de sua replicação, ou reagir com proteínas contendo enxofre para inibir sua função enzimática, sendo este e o fósforo encontrados em abundância em toda a membrana celular (Morones et al., 2005). Sete níveis micromolares de íons de Ag foram relatados para desacoplar o transporte de elétrons para a função respiratória e de fosforilação oxidativa, que inibe as enzimas da cadeia respiratória ou interfere com a permeabilidade da membrana para prótons e fosfato (Duran et al., 2005).

Neto et al. (2008) relataram que a interação ocorre com a membrana celular dos microrganismos causando danos no processo de respiração celular, sendo que no interior destas células, as AgNp interagem com o DNA provocando a sua desnaturação e impedindo a divisão celular. Feng et al. (2000) e Matsumura et al. (2003) descreveram que íons de Ag liberados das Np podem atuar no fosfato das moléculas do DNA, resultando na inativação da sua replicação. Outro mecanismo seria a reação com proteínas contendo enxofre, induzindo a inibição de funções enzimáticas respiratórias.

A interação da prata iônica, a qual pode ser liberada por Np, com grupos tiois (-SH) e formação de S-Ag ou formação de pontes dissulfeto, podem danificar as proteínas bacterianas, interromper a cadeia de transporte de elétrons e danificar o DNA (Feng et al., 2000). De forma similar, íons Ag possuem atividade antiviral pela sua interação com DNA e grupos tiois em proteínas (KIM et al., 2007).

Os grupos tiois (-SH) das bactérias reagem com as proteínas que a Ag marcou, e como a Ag está ligada às proteínas (enzimas), ocorre a inativação (Feng et al., 2000). Ocorre também a ligação da Ag a grupos doadores de elétrons que contêm nitrogênio, oxigênio, e enxofre, tais como aminas, hidroxilas, fosfatos das células (Thurman e Gerba, 1989; RUSSELL et al., 2004). Pode ocorrer também a ligação da Ag com o DNA nas bactérias (Thurman e Gerba, 1989). A Ag desloca as ligações de hidrogênio entre átomos adjacentes de nitrogênio de bases de purina e pirimidina, o que pode estabilizar a hélice do DNA e impedir a sua replicação e a divisão celular subsequente (Lagarón et al., 2012).

- Alteração na membrana citoplasmática

As AgNp podem interferir de forma negativa nas funções de permeabilidade ao interagir diretamente com a membrana bacteriana aderindo e penetrando no interior da célula, induzindo a formação de falhas na membrana celular e, como consequência, causando o vazamento do conteúdo celular (Smentana et al., 2008).

Para Franco (2008), o mecanismo de ação é devido aos íons Ag que causam a precipitação de proteínas e age diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana, exercendo ação bactericida imediata e ação bacteriostática residual. Acredita-se também que as AgNp interagem

com elementos da membrana celular das bactérias, causando danos estruturais, forçando a dissipação de prótons, e finalmente a morte celular (Lok et al., 2006).

Morones et al. (2005) afirmaram que a ligação destas partículas na célula depende da área de superfície disponível para a interação. As menores partículas têm uma área muito maior de superfície disponível para interagir com o microrganismo, portanto são mais eficazes no combate aos microrganismos quando comparadas com partículas maiores.

Seong e Lee (2017) relataram o efeito das AgNp contra *Salmonella enterica* sorotipo typhimurium. O ensaio de N-fenil-1-naftilamina demonstrou que a permeabilidade da membrana externa não foi alterada pelo tratamento com AgNp. O teste de O-nitrofenil-p-D-galactopiranosídeo demonstrou que a permeabilidade da membrana interna aumentou à medida que a concentração de AgNp aumentou. Conclui-se que as AgNp afetaram a membrana interna sem danos na membrana externa. Geralmente, as ERO e as alterações no gradiente de Ca^{2+} são conhecidas por contribuir para a morte celular bacteriana. Os autores relataram que as AgNp induziram o acúmulo de ERO e Ca^{2+} intracelular.

- Interação direta com os microrganismos

As AgNp possuem melhor interação com os microrganismos porque possuem maior área superficial. Assim, as AgNp atacam a superfície celular e penetram com mais facilidade no interior desses microrganismos (Wong et al., 2010). Com isso, vai haver captação de íons de Ag gerados através da dissolução oxidativa de AgNp. Células bacterianas expostas a íons de Ag poderiam sofrer alterações morfológicas como por exemplo o deslocamento da membrana celular permitindo assim o vazamento do conteúdo intracelular (Asharani et al., 2008).

- Alterações no interior das células dos microrganismos

Dentro da mitocôndria, as AgNp ou os íons de Ag podem provocar danos na cadeia respiratória, levando o microrganismo à morte (Wong et al., 2010).

As AgNp em contato com os microrganismos unicelulares incapacitam as suas enzimas de metabolizar o oxigênio. Dentro de poucos minutos, geralmente cinco minutos, o microrganismo patogênico morre e é eliminado do corpo pelo sistema imunológico e linfático. Ao contrário dos antimicrobianos farmacêuticos que desnaturam as enzimas benéficas, as AgNp deixam estas enzimas celulares e tissulares intactas (Gavilanes, 2010).

Feng et al. (2000) sugeriram que o efeito de íons de Ag nas bactérias pode ser observado pelas mudanças estruturais e morfológicas. Isto é, quando as moléculas de DNA estão em estado relaxado, a replicação do DNA pode ser realizada de forma eficaz. Mas quando o DNA está na forma condensada, ele perde sua capacidade de replicação, portanto, quando os íons Ag penetram no interior da célula bacteriana, a molécula de DNA passa para a forma condensada e perde a sua capacidade de replicação, levando à morte celular. Além disso, os autores supracitados relatam que os metais pesados reagem com as proteínas que ficam ligadas com o grupo tiol e as proteínas ficam inativadas.

- Interação do tamanho e forma das nanopartículas e sua capacidade de ação

O tamanho e a forma da Np levam a diferenças na sua capacidade de ação. A ressonância do plasma na superfície desempenha papel importante na determinação de espectros de absorção

óptica de nanopartículas metálicas, que se desloca para um comprimento de onda maior com o aumento do tamanho das partículas. O tamanho das Np implica em uma área de superfície maior para entrar em contato com as células bacterianas e, por conseguinte, terá uma maior porcentagem da interação de partículas (Morones et al., 2005). As Np menores que 10 nm interagem com as bactérias e produzem efeitos eletrônicos que aumentam sua reatividade. Assim, é corroborado que o efeito bactericida de AgNp é dependente do tamanho (Raimondi et al, 2005; Morones et al., 2005). A eficácia antimicrobiana das Np depende da forma estrutural, que também pode ser confirmada através do estudo da inibição de crescimento bacteriano por Np com formas diferentes (Morones et al., 2005). De acordo com Pal et al. (2007), nanopartículas triangulares mostram inibição bacteriana com teor de Ag de 1 ug, enquanto, no caso das nanopartículas esféricas, 12,5 ug são necessárias. As partículas em forma de haste necessitam de um total de 50 a 100 ug de teor de Ag. Assim, as AgNp com diferentes formas têm efeitos diferentes sobre célula bacteriana.

De acordo com Martínez-Castañón et al. (2008), AgNp menores são mais eficientes associado à sua maior área superficial por volume, o que permite melhor contato com as células microbianas. Os autores avaliaram o efeito antimicrobiano de AgNp de três tamanhos (7 nm, 29 nm e 89 nm). Os valores de MIC para *S. aureus* e *E. coli* foram mais elevados com o aumento do tamanho das AgNp, sendo que as de 7 nm apresentaram os melhores efeitos antimicrobianos.

- Outros processos de interação

De acordo com Xiu et al. (2012), a atividade antimicrobiana das AgNp é explicada exclusivamente pela liberação de íons Ag^+ e que as AgNp não apresentam um efeito direto específico da partícula. As AgNp perdem a capacidade antimicrobiana sob condições anaeróbias, em que a liberação de íons Ag^+ é cessada, enquanto os íons Ag^+ mantem sua atividade sob aerobiose e anaerobiose (Xiu et al., 2011).

No entanto, em outros trabalhos descreveu-se que a atividade antimicrobiana das AgNp aumenta gradativamente quando são expostas ao ar por 6 h ou 48 h. Esses trabalhos ainda reportaram que fatores como tamanho, forma, revestimento de superfícies (estabilizantes) e carga superficial, alteram a atividade antimicrobiana das AgNp, provavelmente, por afetarem a taxa, a extensão ou o tempo de liberação de íons Ag^+ . A atividade antimicrobiana das AgNp está relacionada com a presença de íons Ag^+ adsorvidos na superfície das AgNp, considerando que apenas as AgNp parcialmente oxidadas apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto as reduzidas (Ag^0) não (Lok et al., 2007).

Há indicações de que a liberação de íons Ag^+ pela oxidação da prata metálica (Ag^0) em contato com a água e oxigênio dissolvido está envolvida no mecanismo de ação bactericida das AgNp (Xiu et al., 2011).

Entretanto, não está claro se a liberação de íons Ag^+ é responsável por toda atividade antimicrobiana das AgNp ou se as próprias AgNp possuem um efeito específico da partícula. Distinguir a atividade antimicrobiana entre AgNp e íons Ag^+ tem sido um desafio para os pesquisadores, pois os experimentos são normalmente realizados na presença de oxigênio e as duas formas, AgNp e íons Ag^+ , coexistem nestas condições (Xiu et al., 2012). As AgNp, geralmente, são lavadas com água pura para remover os íons Ag^+ antes dos testes toxicológicos (Sondi e Solopek-Sondi, 2004; Liu e Hurt, 2010); portanto isso pode mascarar os efeitos mencionados.

- Diferenças de atuação em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

As bactérias são classificadas em Gram-negativas e Gram-positivas e esta diferença está na estrutura de membrana de cada tipo de bactéria. Estas diferenças estruturais encontram-se no peptídeoglicano, que é um componente essencial na sua organização. As bactérias Gram-negativas possuem apenas uma fina camada de peptídeoglicano (~ 2-3 nm) entre a membrana citoplasmática e a membrana externa (Murray et al., 1965), enquanto as Gram-positivas não possuem a membrana exterior, e possuem apenas uma camada de peptídeoglicano de cerca de 30 nm de espessura (Shockman e Barret, 1983).

Estas diferenças estruturais na composição da parede celular das bactérias resultam na diferença da susceptibilidade à Ag das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Fayaz et al., 2010). As AgNp apresentam efeito bactericida maior sobre bactérias Gram-negativas do que nas Gram-positivas, em razão da diferença estrutural da parede celular entre essas bactérias (Shrivastava et al., 2007; Fayaz et al., 2010; Huang et al., 2017). Entretanto, esta diferença não está totalmente compreendida. Uma das explicações é que as bactérias Gram-negativas possuem fina camada de peptídeoglicano, permitindo absorção mais rápida dos íons na célula. Os íons de prata (Ag^+) ligam-se ao peptídeoglicano da parede celular carregado negativamente prejudicando a respiração celular pelo bloqueio do sistema de transferência de energia, causando a morte celular (Nawaz et al., 2012).

Gray et al. (2003) afirmaram que bactérias Gram-positivas possuem espessa camada de peptídeoglicano, constituindo-se em cadeias de polissacarídeos ligadas entre si por pequenos peptídeos, formando uma estrutura tridimensional rígida. A rigidez e as ligações cruzadas tornam a parede celular das bactérias Gram-positivas, local com poucos sítios de ancoragem e de difícil penetração (Fayaz et al., 2010; Shrivastava et al., 2007).

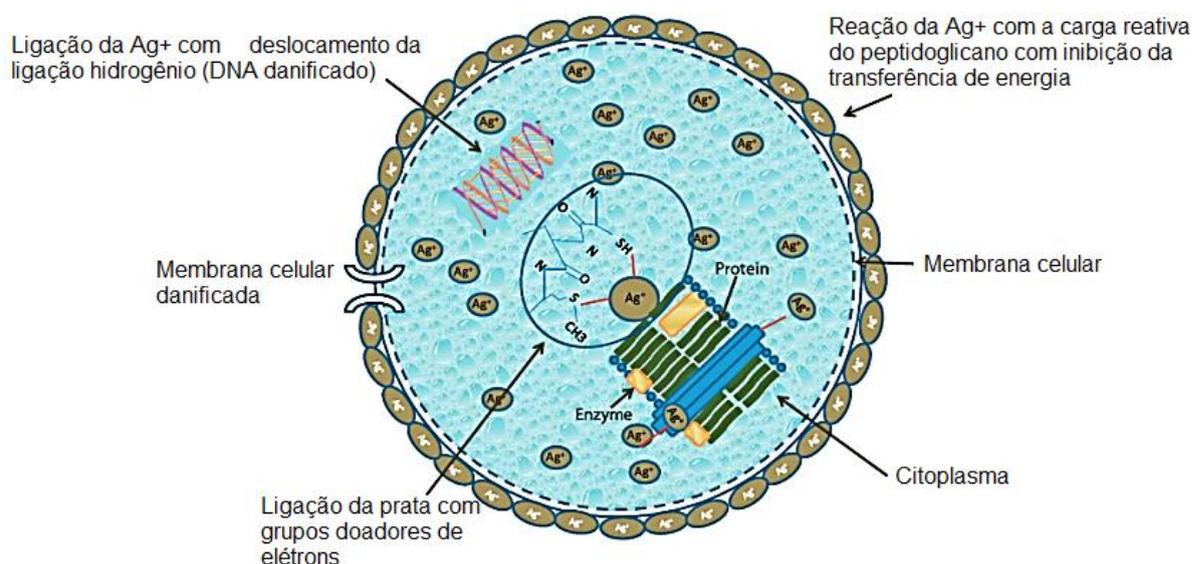


Figura 4 - Diferentes maneiras de ação da Ag na célula bacteriana.
Fonte: Nawaz et al. (2012)

Morones-Ramirez et al. (2013) relataram que o íon Ag interrompe vários processos celulares em bactérias Gram-negativas, incluindo a formação de ligações sulfeto, o metabolismo central e a

homeostase de ferro. Essas alterações estão associadas ao aumento da produção de ERO e o aumento da permeabilidade da membrana, os quais seriam responsáveis por causar morte bacteriana.

2.2.4 Prováveis efeitos tóxicos, tópicos e sistêmicos da prata no organismo animal

Existe atualmente um intenso debate quanto às implicações futuras da nanotecnologia que englobam questões sobre a toxicidade, impactos ambientais dos nano materiais e efeitos potenciais na economia global. Esses aspectos, ainda indefinidos, interferem na regulação da nanotecnologia (Furlaneto, 2011). Outro fator a ser discutido é em relação ao acúmulo da Ag no organismo dos animais tratados, ainda pouco estudados.

2.2.4.1 Legislação

Em outubro de 1994, o *Food and Drug Administration* (FDA) emitiu um Boletim de Saúde e Fraudes para resolver a comercialização de produtos emergentes de prata coloidal oferecidas para uso em condições mais graves de doença. Nesse boletim existe a afirmação de que não se tem conhecimento de qualquer evidência científica substancial que demonstre que qualquer solução coloidal de prata é útil para prevenir ou tratar qualquer doença grave e que o FDA não aprovou nenhum novo medicamento ou produto com prata coloidal. Os comerciantes destes produtos afirmam que seus medicamentos estão livres de registros, pois são comercializados antes de 1938, período que não era necessário registros (FDA, 1996; FDA, 1999).

Apesar do FDA não permitir o uso da prata coloidal em animais de produção, a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) propôs recentemente uma aprovação condicional para utilização das AgNp como antimicrobiano [EPA-HQ-OPP-2009- 0936; FRL-8806-9], criando, assim, uma jurisprudência para a futura regulamentação ou níveis de tolerância dentro de gêneros alimentícios (Mudalige e Linder, 2013).

Neste sentido, cientistas do *National Center for Toxicological Research* (NCTR) estão estudando várias vias de exposição aos nano materiais e os efeitos sobre o corpo humano. Esta informação permite uma melhor compreensão dos nano materiais que podem então ser usados para informar as decisões regulatórias. A exposição às nano partículas, especificamente à AgNp, por causa de seu uso como antimicrobiano, em alimentos ou em embalagem é o maior risco relacionado para os consumidores. Os cientistas estão estudando as AgNp ingeridas por roedores para identificação de perigos e desenvolver métodos para medir a migração das AgNp, fornecendo dados para decisões regulatórias. No ano de 2013, os cientistas descobriram que alguns nano materiais, como as AgNp, interagem com as células da barreira hemato-encefálica e geram uma reação adversa (FDA, 2015).

De acordo com a *Environmental Protection Agency-USA* (EPA, 1987), doses de 5 µg/ kg/dia de Ag são aceitáveis com improváveis riscos para a saúde, sendo a dose limite de 14 µg /kg/dia. Uma pessoa com um peso de 70 kg em uma dieta regular pode consumir até 90 µg /dia de Ag.

Em 2014, foi publicado o parecer final sobre “Nanosilver: segurança, saúde e efeitos ambientais e papel na resistência antimicrobiana”, que concluiu que o uso generalizado (e crescente) de produtos contendo Ag implica que tanto os consumidores e o ambiente estão expostos a novas fontes de Ag. A exposição humana é direta (alimentos, mão-a-boca contato, pele) e pode ser por toda a vida; enquanto que no ambiente as AgNp podem contaminar e atuar sobre os organismos

no solo, da água e do sedimento e podem funcionar como fontes de prata iônica ao longo de períodos de tempo prolongados. Portanto, os efeitos adicionais decorrentes da utilização generalizada e de longo prazo de AgNp não pode ser descartada. Em relação ao risco associado à divulgação do mecanismo de resistência após o uso das AgNp, não há estudos disponíveis neste momento, o que representa uma grave lacuna de conhecimento. Outras Np têm aumentado substancialmente a transferência horizontal de genes entre bactérias - o que é extremamente relevante e grave para o desenvolvimento de resistência, portanto o potencial das AgNp para induzir efeitos semelhantes deve ser analisado. Mais dados são necessários para entender melhor as respostas bacterianas e a exposição a Ag iônica e as AgNp. Uma vez que os mecanismos que resultam em resistência das AgNp não são bem compreendidos, não é possível estimar neste momento se a resistência dos microrganismos irá aumentar ou propagar em vista de uma utilização mais generalizada das AgNp em produtos (Scenihr, 2014).

Embora os regulamentos para a Ag coloidal variem em diferentes continentes, na Austrália, América do Norte, órgãos reguladores europeus geralmente desaprovam a prata coloidal. No início de 2010, a prata coloidal foi realmente proibida na Europa.

A Legislação Brasileira ainda não regulamenta o uso da AgNp. Em alguns produtos comercializados contendo Ag, é descrito no rótulo: “Produto dispensado de registro, de acordo com a RDC 278/2005 da Anvisa”. Porém, quanto à Ag coloidal, existem inúmeros produtos registrados na Anvisa e no Ministério da Agricultura, para utilização em produtos humanos e animais.

2.2.4.2 Intoxicação pela prata

Alguns estudos *in vitro* revelam que as AgNp poderiam causar forte citotoxicidade em um largo espectro de células (Tang et al., 2010). Dakal et al. (2017) afirmam que a exposição de células humanas à AgNp induz a citotoxicidade, a genotoxicidade e a resposta inflamatória.

São várias as rotas de exposição de um nanomaterial no ambiente, [sistemas aquáticos, da atmosfera (troposfera), do solo e sedimento]. As principais rotas de entrada dos nanomateriais nos organismos-receptores são: absorção no nível celular, inalação, ingestão e assimilação através de superfícies epiteliais externas (Paschoalino et al., 2010).

Atualmente, pouco se sabe sobre o mecanismo de toxicidade das AgNp. No entanto, estudos anteriores têm fornecido fortes evidências de uma ligação entre a produção de ERO mediados por AgNp, o estresse oxidativo e a citotoxicidade (Liu et al., 2010).

Para verificar o efeito tóxico da Ag em células de animais, Hunta et al. (2013) utilizaram o *Caenorhabditis elegans*, que é um animal vermiforme, não segmentado e com simetria bilateral. Os autores verificaram que a exposição à AgNp de 10 nm reduziu o crescimento e desenvolvimento das larvas de *C. elegans* em concentrações ambientais de 10 mg/mL⁻¹ e levou a danos oxidativos no seu DNA. Muitos estudos também relataram que as AgNp induziram a genotoxicidade em vários tipos de células (Kim et al., 2011).

Íons de metais, incluindo Ag, atuam como catalisadores e podem produzir ERO na presença de oxigênio, o que é considerado como um mecanismo de toxicidade e genotoxicidade para os nanomateriais metálicos. Atuando como sinal molecular, ERO pode promover a progressão do ciclo celular e induzir dano oxidativo ao DNA (Boonstra e Post, 2004).

Várias alterações tóxicas foram relatadas em peixes e embriões após exposição à Np, ou seja, alterações nos marcadores de estresse oxidativo, tais como oxidação de lipídios, apoptose e alterações na expressão do gene (Zhu et al., 2006). Além disso, *in vivo* e os estudos *in vitro* sobre a inflamação do pulmão e do estresse oxidativo devido a várias Np inaladas têm sido publicados. No entanto, o estresse oxidativo e inflamação estão interligados. É conhecido que as citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de ativação da família de óxido nítrico (NOx) e NADPH oxidase, resultando numa produção maciça (Gaillet e Rouanet, 2015).

Zhang et al. (2014) apontaram que os elétrons na superfície ativa das AgNp podem induzir diretamente a geração de ERO. Além disso, a dissolução de íons de Ag⁺ em AgNp desencadeia a produção de hidroxilo. Isso também é descrito por Sarkar et al. (2014).

A geração de ERO e a indução do estresse oxidativo, que são conhecidos por estarem associadas a doenças cardiovasculares e a doenças do cérebro tais como a doença de Parkinson e doença de Alzheimer, são os principais mecanismos envolvidos nos efeitos toxicológicos de Np. Os radicais ânion superóxido (O₂⁻), radicais hidroxila (OH), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são as principais causas de estresse oxidativo (Gaillet e Rouanet, 2015). As alterações mitocondriais mediadas pelas ERO, danos ao DNA e a apoptose são observados na maioria dos trabalhos com diferentes linhagens celulares (Zhang et al., 2016).

Em experimentos utilizando células humanas, Mukherjee et al. (2012) analisaram os efeitos das AgNp em duas linhagens de células humanas de câncer cervical. O resultado demonstrou que o efeito citotóxico de AgNp foi dependente da dose e do tempo de exposição na linhagem de células testada. Verificou-se que as AgNp induziram níveis elevados de estresse oxidativo, esgotamento da glutatona e danos à membrana celular.

Os sintomas clínicos mais comuns associados à exposição crônica da Ag são um cinza permanente ou coloração azul-acinzentada da pele e outros órgãos (Drake e Hazelwood, 2005). O contato persistente com a Ag causa manchas cinzentas na pele do rosto, grande ansiedade, medo de altura, incapacidade de ficar parado, tendência a fazer tudo depressa e a acelerar os outros, sensação de cabeça oca, sonhos com cobras, abismos e insetos voadores (Teixeira, 2015).

Em baixo nível de exposição, há deposição da Ag na pele e em outras partes do corpo, tais como fígado, cérebro, músculos e nos rins, e pode haver alterações nas células sanguíneas (Fung e Bowen, 1996). A exposição a níveis elevados da Ag no ar pode resultar em problemas respiratórios, pulmão e irritação da garganta e dores de estômago. Contato da pele com a Ag pode causar reações alérgicas, incluindo erupções cutâneas, inchaço e inflamação em algumas pessoas (Basmaji, 2013).

Estima-se que apenas 10 % dos compostos de Ag ingeridos sejam absorvidos pelo corpo, e 2 a 4% sejam retidos nos tecidos (Klein, 1978). A Ag pode ser mensurada na urina, no sangue e principalmente nas fezes (Phalen e Morrow, 1973). Pode ser determinada com precisão no sangue que é, portanto, o meio biológico de escolha devido à sua conveniência (Armitage et al., 1996). A análise da urina é útil apenas quando ocorre um elevado grau de exposição, pois a Ag é pouco excretada na urina (Juberg e Hearne, 2001).

Pessotto (2013), ao determinar os efeitos das AgNp isoladamente e associadas a pesticidas organoclorados em macrófagos peritoneais de camundongo, demonstrou que a maior

concentração de AgNp foi altamente citotóxica e resultou em alterações morfológicas, aumento dos níveis de óxido nítrico.

Mesmo que a Ag não esteja disponível em concentrações altas o suficiente para constituir risco para a saúde humana e ao meio ambiente, as AgNp têm propriedades físicas e de superfície que podem representar ameaça à saúde humana e ambiental (Lee et al., 2012). Devido às diferentes propriedades físico-químicas e atividades biológicas das AgNp, quando comparadas com o metal normal, não pode ser excluído que o aumento da reatividade das AgNp (devido à grande área de superfície) leve ao aumento da toxicidade. Algumas Np podem penetrar no pulmão, pele, sistemas circulatório e linfático de seres humanos e animais, atingindo os tecidos e órgãos do corpo e, potencialmente, interrompendo os processos celulares causando doenças (Basmaji, 2013).

Existe grande interesse sobre a diferença na captação celular, na distribuição no tecido, e a toxicidade entre a forma iônica (Ag^+) e as AgNp. Arai et al. (2014) estudaram a distribuição de Ag no tecido do pulmão e respostas inflamatórias seguintes à instilação intratraqueal de nitrato de prata ($AgNO_3$) e AgNp em camundongos. O resultado demonstrou que a forma iônica de Ag parece translocar a partir do pulmão para os outros tecidos rapidamente e $AgNO_3$ causou uma infiltração mais robusta de neutrófilos no pulmão do que AgNp. A citotoxicidade de AgNp foi menor que a de $AgNO_3$ em células J774.1.

Wen et al. (2017) avaliaram os efeitos da toxicidade aguda pelas AgNp em ratos e os resultados demonstraram que o órgão com maior acúmulo foram o pulmão, seguido do baço, fígado, rim, timo e coração. A administração de AgNp induziu aumento de aspartato aminotransferase, ureia, fósforo sérico e creatinina, além de lesões histológicas no fígado. De acordo com Austin et al. (2012), no corpo humano, as AgNp afetam o pulmão, fígado, baço e rim e também penetram no sistema nervoso central (SNC).

De Matteis et al. (2015) avaliaram o mecanismo de toxicidade induzida por AgNp. Dois tecidos diferentes foram expostos, células HeLa e A549, para verificação do impacto sobre a viabilidade celular através da atividade metabólica, produção de ERO, necrose e vias de apoptose, bem como a genotoxicidade. Observou-se que as células A549 foram mais resistentes do que as HeLa ao tratamento com AgNp e foi confirmada a capacidade das Np induzirem o estresse oxidativo. Também foi avaliada a genotoxicidade que demonstrou alto nível de danos no DNA depois da administração das AgNp. De acordo com Vimbela et al. (2017), as AgNp liberam íons de Ag que interagem com os fios de DNA dentro do núcleo celular, o que resulta em danos ao DNA.

A caspase-3 desempenha um papel chave em diversos mecanismos de apoptose, e os resultados mostram o aumento nos níveis de caspase-3 após 24 h de tratamento, provando que a caspase-3 desencadeadora de apoptose ocorreu na presença de AgNp. Os dados demonstram que a liberação de íons Ag é fortemente promovida pelo ambiente ácido da célula. Demonstrou-se também que em altas concentrações de AgNp, há morte celular. As técnicas utilizadas no experimento revelaram que as células tratadas com as AgNp regulam positivamente expressão de MT (metalotioneínas), que são proteínas pequenas localizadas no aparelho de Golgi e envolvidos na regulação de metais. Esse fenômeno progressivamente aumentou ao longo do tempo, sugerindo mecanismos de toxicidade por metais pesados. Além disso, foi demonstrado que é possível proteger as células contra lesões por AgNp, através da administração de agentes quelantes (De Matteis et al., 2015).

Alguns estudos sugerem que as AgNp podem causar inflamação do trato digestivo (Lomer et al., 2002). No entanto, a distribuição de AgNp após a ingestão oral difere de acordo com o modelo

utilizado e a AgNp. Depois da absorção intestinal, algumas AgNp são excretadas nas fezes e urina (Nefzger et al., 1984) e outros entram na circulação porta hepática e no sistema linfático ou do fígado (Gaillet e Rouanet, 2015). Van Der Zande et al. (2012) mostraram a excreção fecal e Park et al. (2011) detectaram Ag em urina de rato e fezes após a ingestão de 1 mg/kg de peso corporal de AgNp com 8 nm. O baço é o órgão alvo, mas algumas AgNp são encontradas nos rins, pulmões, medula óssea, cérebro, pele, baço, olhos, músculos, sangue, intestino, estômago, pulmão, bexiga, próstata, língua, dentes, glândulas salivares, tireoide, paratiróide, coração, pâncreas e duodeno.

2.3 Análise de resíduos de prata por métodos analíticos

2.3.1 Validação

A validação de um método é um componente essencial das medidas que um laboratório deve implementar a fim de produzir dados analíticos confiáveis (Eurachem, 1998). Além das características de desempenho do método comum obtido no processo de validação, laboratórios de pesquisa devem dispor de procedimentos para estimar a incerteza das medições (International Organization for Standardization, 2005).

Atualmente há várias definições sobre validação de métodos analíticos, todavia, os conceitos relacionados a esse procedimento continuam evoluindo constantemente e, concomitantemente quando se aplica, incorporados pelas agências reguladoras. Algumas definições podem ser transcritas:

- (a) “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (Anvisa, 2017);
- (b) “Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para dado uso intencional” (ISO/IEC 17025);
- (c) “O objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado para a sua finalidade. Um somatório tabular das características aplicáveis a identificação e controle das impurezas” (ICH, 1996);
- (d) “A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (FDA, 2015);
- (e) “Validação é a verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido” (VIM, 2012);
- (f) “Validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendam aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de estudo experimental e integralmente documentado. A validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões” (Brasil, 2011a).

Perante a legislação internacional, a validação pode ser construída segundo normas do ICH. A orientação foi desenvolvida pelo Grupo de trabalho de peritos do ICH e tem sido objeto de consulta entre os órgãos reguladores de outras partes do mundo e é recomendado para aprovação às entidades reguladoras da União Europeia, Japão e EUA (ICH, 1996).

No Brasil, os testes de validação de metodologia são regulamentados pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166 de 24 de Julho de 2017 (Anvisa, 2017). Para medicamentos e produtos

veterinários, segue o “Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação e Medicamentos Veterinários”, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária (Brasil, 2011). E também pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) através do Manual de “Orientação sobre validação de métodos analíticos” (DOQ-CGCRE-008) de 2016 (INMETRO, 2016).

2.3.2 Métodos de validação

De acordo com o INMETRO (2016), os parâmetros devem ser avaliados de acordo com o tipo de ensaio e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que para a validação do método de quantificação deve ser feita uma classificação dos ensaios segundo sua finalidade e parâmetros mínimos, que devem ser avaliados conforme a categoria do ensaio analítico (Brasil, 2011a). Na **Tabela 1** são demonstrados os parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio determinados pelo INMETRO (2016). Nas **Tabela 2** e **Tabela 3**, os ensaios físico-químicos foram agrupados em categorias distintas e, posteriormente, para cada categoria são indicados os parâmetros mínimos de desempenho que devem ser avaliados durante a validação do procedimento analítico (Brasil, 2011a).

Tabela 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.

Parâmetros	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade	√	√
Linearidade / faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho /Sensibilidade		√
Limite de detecção	√	√
Limite de quantificação		√
Tendência / recuperação		√
Precisão		√
Robustez	(*)	(*)

(*) parâmetro opcional

Fonte: INMETRO (2016)

Tabela 2 - Classificação dos ensaios segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Teste quali-quantitativos para a determinação do princípio ativo em medicamentos veterinários, matérias-primas, produtos para alimentação animal e matrizes de origem biológica.
II	Testes quali-quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos veterinários e matérias-primas e ensaio limite.
III	Testes de desempenho (e.g.: dureza, friabilidade, viscosidade).
IV	Testes de identificação para ingrediente ativo (e.g.: identificação de substância por espectroscopia no infravermelho).
V	Testes quali-quantitativos para determinação de traços de fármacos em ração (contaminação cruzada).

Fonte: Brasil (2011a)

Tabela 3 - Parâmetros que devem ser estudados na validação do procedimento analítico, de acordo com sua finalidade e categoria.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	Categoria V
		Quali-quantitativo	Ensaio limite			
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	Sim
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Limite de detecção	*	Não	Sim	*	Sim	Sim
Limite de quantificação	*	Sim	Não	*	Não	Sim
Veracidade/Recuperação	Sim	Sim	*	*	Não	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

Fonte: Brasil (2011a).

Destaca-se que o preparo de amostras é de fundamental importância para um procedimento de validação bem-sucedido e, portanto, devem ser considerados os analitos de interesse e suas faixas de concentração, a complexidade da matriz e as técnicas analíticas empregadas (Souza e Junqueira, 2005).

2.3.2.1 Seletividade e especificidade

Seletividade e especificidade são os primeiros critérios a serem avaliados em um método analítico. Consistem na capacidade do método fornecer sinais ou respostas que estão livres de interferências e garantem resultados verdadeiros, ou seja, a medição realizada pelo sistema é capaz de fornecer valores para um ou vários analitos mensurados, tal que os valores de cada analito sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas relacionadas ao processo em estudo (ICH, 1996; Brasil, 2011a; INMETRO, 2016).

De acordo com Anvisa (2017), a RDC 166/17 determina para medicamentos humanos que métodos analíticos aplicados aos produtos sob investigação utilizados em ensaios clínicos devem ter sua adequabilidade demonstrada de acordo com esta situação.

2.3.2.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (Anvisa, 2017).

A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio. Sempre que possível, o valor esperado para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva de calibração (Brasil, 2011a; Eurachem, 2014).

Esta etapa deve ser realizada em pelo menos cinco níveis de concentração e em triplicata. Os ajustes da curva de calibração obtida não devem ser forçados a passar pela origem e a concentração esperada para as amostras devem estar dentro do *range* da curva de calibração construída (Brasil, 2011a).

O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$ (Anvisa, 2017). Porém, Brasil (2011a) e Brasil (2011b) descrevem que o mínimo deve ser $r^2=0,995$.

A relação linear deve ser avaliada através de uma escala analítica. Pode ser demonstrada diretamente sobre a substância (por diluição de um padrão de estoque) ou através de pesagens separadas de misturas sintéticas dos componentes do produto de cada droga, usando o procedimento proposto (ICH, 1996).

A linearidade deve ser avaliada através de inspeção visual de um lote de sinais como uma função da concentração do analito ou conteúdo. Se existe uma relação linear, os resultados dos testes devem ser avaliados por métodos estatísticos adequados, por exemplo, por cálculo de uma linha de regressão pelo método de mínimos quadrados. Em alguns casos, para obter linearidade entre as dosagens e as concentrações da amostra, os dados de teste podem ter que ser submetido a uma transformação matemática antes da regressão (ICH, 1996).

2.3.2.3 Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada através da participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo (Brasil, 2011a).

Normalmente é determinada para circunstâncias específicas de medição e as três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2016).

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) (INMETRO, 2016; Anvisa, 2017), é calculado com seguinte fórmula:

$$CV = DPR = (DP / CMD) \times 100$$

Sendo:

DP é o desvio padrão;

CMD é a concentração média determinada.

Em condições de repetitividade, o coeficiente de variação deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados na **Tabela 4**, conforme a concentração.

No caso de análises repetidas de uma amostra em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação intralaboratorial da média não deve exceder aos valores especificados na **Tabela 4**. A Precisão estimada em Função da Concentração do Analito no Produto/Matriz (Brasil, 2011a).

Tabela 4 - Coeficiente máximo admitido, de acordo com a concentração do analito.

Concentração (C)	Coeficiente de variação (%)
$C < 1 \text{ mg/Kg}$	35
$1 \text{ mg/Kg} \leq C < 10 \text{ mg/Kg}$	30
$10 \text{ mg/Kg} \leq C < 100 \text{ mg/Kg}$	20
$100 \text{ mg/Kg} \leq C < 1000 \text{ mg/Kg}$	15
$1000 \text{ mg/Kg} \leq C < 10000 \text{ mg/Kg}$	10
$10 \text{ mg/Kg} \leq C < 100 \text{ mg/Kg}$	7,3
$100 \text{ mg/Kg} \leq C < 1000 \text{ mg/Kg}$	5,3
$1000 \text{ mg/Kg} \leq C < 10000 \text{ mg/Kg}$	3,7

Fonte: Brasil (2011^a)

2.3.2.4 Limite de detecção

Limite de detecção (LD) é um parâmetro qualitativo no qual mostra-se a menor quantidade do analito que pode ser detectada com adequada precisão e exatidão pelo método analítico utilizado (ICH, 2005; Nata, 2013) ou o teor mínimo a partir do qual é possível deduzir a presença do analito com certeza analítica razoável (95% de confiança) (Brasil, 2011b). Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2016).

Este parâmetro é avaliado com a concentração do analito que produz um sinal três vezes a razão sinal/ruído do equipamento (Brasil, 2011a), o que pode ser feito experimentalmente ou através da aplicação da relação matemática por estimativa a partir da curva analítica (INMETRO, 2016; Anvisa, 2017).

O cálculo pode ser realizado pela leitura do sinal da matriz branca, seguindo a fórmula descrita em Brasil (2011b):

$$LD = 3 \times s$$

Sendo:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca ($n > 20$).

2.3.2.5 Limite de quantificação

Limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005).

Para a determinação deste parâmetro é necessário avaliar os dois extremos da curva de calibração, o limite inferior no qual mensura quantitativamente a menor concentração do analito de uma amostra com precisão e exatidão adequada e o limite superior o qual mensura quantitativamente a maior concentração do analito de uma amostra com precisão e exatidão pelo método analítico aplicado (FDA, 2015).

Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Esse limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LQ (INMETRO, 2016). Existem diversas formas de calcular o LQ, porém a Anvisa (2017) determina o uso da fórmula baseada na estimativa a partir da curva analítica.

Se a veracidade e a precisão são constantes em uma gama de concentrações centradas no limite de detecção, o limite de quantificação é numericamente igual a seis ou dez vezes o desvio-padrão da média de ensaios em branco ($n > 20$) (Brasil, 2011b).

$$LQ = 10 \times s$$

Sendo:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca ($n > 20$).

2.3.2.6 Acurácia

A acurácia de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor que é aceito como valor verdadeiro convencional ou valor de referência aceito e o valor encontrado. Isso às vezes é chamado de veracidade (ICH, 1994; Vim, 2012).

O vocabulário internacional de metrologia define a veracidade como “grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência” (Vim, 2012).

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou à correção ou ao fator de correção. A

recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade (Brasil, 2011a).

A veracidade do procedimento deve estar compreendida nos intervalos especificados na **Tabela 5** ao redor de 100%, de acordo com as respectivas concentrações. Excepcionalmente, valores fora das faixas poderão ser aceitos desde que devidamente justificados (Brasil, 2011a).

Tabela 5 - Faixa de Aceitação do Fator de Acurácia.

Concentração (C)	Intervalos (%)
$C < 1 \mu\text{g/Kg}$	50 a 120
$1 \mu\text{g/Kg} \leq C < 10 \mu\text{g/Kg}$	70 a 110
$10 \mu\text{g/Kg} \leq C < 100 \mu\text{g/Kg}$	80 a 110
$100 \mu\text{g/Kg} \leq C < 1000 \mu\text{g/Kg}$	80 a 110
$1000 \mu\text{g/Kg} \leq C < 10000 \mu\text{g/Kg}$	80 a 110
$10 \text{mg/Kg} \leq C < 100 \text{mg/Kg}$	90 a 107
$100 \text{mg/Kg} \leq C < 1000 \text{mg/Kg}$	95 a 105
$1000 \text{mg/Kg} \leq C < 10000 \text{mg/Kg}$	97 a 103
$10 \text{g/Kg} \leq C < 100 \text{g/Kg}$	98 a 102
$100 \text{g/Kg} \leq C \leq 1000 \text{g/Kg}$	98 a 102

Fonte: Brasil (2011a)

Para determinar a veracidade/recuperação, devem-se analisar seis réplicas de material de referência certificado – MRC ou de amostra/matriz branca, antes e após fortificação com os padrões de calibração, em no mínimo três níveis de concentração. Quando a recuperação é obtida a partir de fortificações de matriz branca, o fator de recuperação Frec é calculado através da equação a seguir: (Brasil, 2011a).

$$\text{Frec} = \text{Cf} - \text{Cnf} / \text{Cad} \times 100$$

Sendo:

Cf = concentração medida após fortificação da matriz branca;

Cnf = concentração medida na matriz branca não fortificada, i.e., antes da fortificação;

Cad = concentração do analito puro adicionado à matriz branca.

2.3.2.7 Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico tem o objetivo de avaliar a capacidade do método de se manter preciso e exato mediante a pequenas variações nas condições experimentais do procedimento analítico. Para a realização deste estudo, o analista deve identificar os parâmetros críticos no procedimento de análise e submetê-los a pequenas variações de modo a

definir qual a sensibilidade do método analítico. Usualmente definem-se valores extremos dos parâmetros analíticos e os submete a análise (ICH, 1996; Brasil, 2011a; Anvisa, 2017). A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira (Eurachem, 2014).

A robustez é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação. Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao planejamento de *Youden* (2002/657/EC) ou de Plackett-Burman (Sergent, 2007), ou a testes estatísticos convencionais (Brasil, 2011a; Brasil, 2011b). Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (INMETRO, 2016).

2.4 Uso e funcionamento do ICP – OES

Os primeiros equipamentos comercialmente disponíveis de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) foram introduzidos em 1974. Desde a sua introdução, há um interesse cada vez maior da química analítica, sendo amplamente utilizado para a rotina de análise elementar. Como poderia ser esperado, a espectrometria de emissão pelo ICP é considerada uma técnica madura em termos de valores analíticos de mérito.

No entanto, por causa de uma forte concorrência entre as várias empresas de instrumentos envolvidos neste campo e as vendas crescentes de sistemas de Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP MS), algumas melhorias nas características analíticas do ICP OES aperfeiçoaram o equipamento (Mermet e Poussel, 1995).

O ICP-OES determina oligoelementos, incluindo metais, em solução. O método é aplicável a todos os elementos listados na **Tabela 6**. A maioria das matrizes deve ter amostras digeridas em ácido para análise no equipamento (METHOD 6010 B, 1996).

Tabela 6 - Recomendação de comprimentos de onda e limites estimados de detecção.

Elemento detectado	Comprimento de onda (nm) (a)	Estimativa IDL (µg/L) (b)
Aluminum	308.215	30
Antimony	206.833	21
Arsenic	193.696	35
Barium	455.403	0.87
Beryllium	313.042	0.18
Boron	249.678 x 2	3.8
Cadmium	226.502	2.3
Calcium	317.933	6.7
Chromium	267.716	4.7
Cobalt	228.616	4.7
Copper	324.754	3.6
Iron	259.940	4.1
Lead	220.353	28
Lithium	670.784	2.8
Magnesium	279.079	20
Manganese	257.610	0.93
Mercury	194.227x2	17
Molybdenum	202.030	5.3
Nickel	231.604x2	10
Phosphorus	213.618	51
Potassium	766.491	See note (c)

Selenium	196.026	50
Silica (SiO ₂)	251.611	17
Silver	328.068	4.7
Sodium	588.995	19
Strontium	407.771	0.28
Thallium	190.864	27
Tin	189.980x2	17
Titanium	334.941	5.0
Vanadium	292.402	5.0
Zinc	213.856 x 2	1.2

Os comprimentos de onda indicados (em que X2 indica segunda ordem) são recomendadas devido à sua sensibilidade e a aceitação geral. Outros comprimentos de onda podem ser substituídos (por exemplo, no caso de uma interferência) se pode proporcionar a sensibilidade necessária e são tratados com a mesma correção técnica de interferência espectral. Com o tempo, outros elementos podem ser adicionados conforme mais informações disponíveis e, se necessário. Os limites de detecção instrumental estimados são fornecidos como um guia para limite e instrumental. Os limites de detecção do método são da amostra real dependente e podem variar como o da amostra matriz. São altamente dependentes das condições operacionais e posição do plasma.

Fonte: METHOD 6010 B (1996)

O ICP OES utiliza para suas análises uma fonte de excitação de plasma de argônio à alta temperatura (7.000 - 10.000 K) e com comprimento de onda variando entre 125 e 950 nm, sendo considerada uma técnica de análise química instrumental. Para a realização das análises, uma amostra é introduzida sob forma de neblina no centro do plasma. As radiações emitidas, após conveniente separação de seus comprimentos de onda por sistemas ópticos, têm suas respectivas intensidades medidas por meios de detectores de radiação específicos (ICP OES, 2008).

Esta técnica é tradicionalmente utilizada para a análise de vários elementos em diferentes matrizes. A técnica de ICP-OES tem sido utilizada amplamente devido a uma série de vantagens que oferece, tais como: análise multielementar simultânea, sensibilidade e precisões altas, rapidez, bem como ampla faixa dinâmica linear. O plasma é uma fonte de alta temperatura que minimiza efeitos de matriz e produz uma sensibilidade adequada para maioria dos metais e não-metais, em diferentes faixas de concentração e esta técnica de análise é aplicável à determinação de sólidos, líquidos e gases e tem a capacidade de produzir resultados rápidos e úteis para controle de processos, tais como, o controle de tratamento de efluentes (Sandroni e Smith, 2002).

O ICP OES é uma opção para análises analíticas muito utilizadas em função da sua capacidade de quantificar macro e micro-elementos em matrizes complexas (Masson et al., 1999). O ICP OES é menos sensível em relação a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) (Gasparics, 2000) e a espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP MS) (Ryan, 1997). Esta limitação do ICP OES, no entanto, pode ser contornada com o posicionamento horizontal da tocha, denominado configuração axial, que leva a um aumento da região de observação, tornando maior a quantidade de radiação que atinge o detector (Brenner et al., 1997).

Porém, Silva (2004) relatou que a configuração axial é susceptível a efeitos de matriz, principalmente, por ser observada a região de maior gradiente de temperatura (*tail flame*). As interferências observadas nesta região ocorrem devido à formação de compostos moleculares e aos elementos ionizáveis. Com o objetivo de amenizar estes efeitos na configuração axial do ICP OES, estes equipamentos são equipados com interfaces apropriadas em dois tipos de arranjos: *shear gas* interface (elevada vazão de gás) (Ar ou N₂) introduzido perpendicularmente à

extremidade superior do plasma, e *end-on* gás interface (vazão comparativamente menor de um gás introduzido frontalmente à extremidade superior do plasma).

No entanto, amostras orgânicas apresentam variações com estas configurações (Changkang et al., 1992), sendo necessárias modificações na configuração do comprimento de onda (Silva, 2004).

O equipamento de ICP OES utiliza soluções próprias para realização de análises. Os reagentes utilizados ou desenvolvidos devem estar em conformidade com as especificações da Comissão dos Reagentes Analíticos da American Chemical Society. Podem ser utilizados outros tipos, desde que seja averiguado que o reagente é de uma pureza suficientemente elevada para permitir a sua utilização sem diminuir a precisão da determinação (METHOD 6010 B, 1996).

De acordo com o mesmo documento citado, o ácido clorídrico (HCl) e o ácido nítrico (HNO₃) podem ser utilizados como reagentes.

2.5 Métodos de extração (digestão)

Todo procedimento de digestão de uma amostra deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de reagentes, permitir a dissolução de grande número de amostras e finalmente, produzir resultados exatos e repetitivos (Kira, 2002).

Os processos de preparação de uma amostra para injeção em um equipamento de ICP OES ou ICP MS podem ser por digestão seca, quando há destruição da matéria orgânica por calcinação da matéria orgânica usando-se um forno de mufla (Hoening, 2001). Esta técnica de digestão aberta, no entanto, expõe a amostra à contaminação ambiental e o procedimento de digestão pode ser muito lento, possibilitando perdas (Kira, 2002).

Na digestão úmida, a matéria orgânica é destruída usando-se ácidos ou oxidantes (como H₂O₂, KMnO₄, HClO₄) (Amaro-López et al., 1996), ou o HNO₃, que pode ser associado ao H₂SO₄, HClO₄ ou ao H₂O₂ (HOENING e KERSABIEC, 1996). Porém, o uso somente de HNO₃, na digestão úmida é insuficiente para oxidar completamente amostras com alto teor de proteína ou gordura (Kira, 2002), como o leite.

A partir da década de 90, houve aumento do uso da técnica de micro-ondas como método de digestão para uso em ICP OES e ICP MS. Estes equipamentos possuem grande capacidade para digestões de amostras de produtos alimentícios e materiais biológicos (Pedro, 1998).

Além dos três métodos citados anteriormente, em matrizes ricas em gorduras e óleo, os métodos de digestão mais eficientes são os que se baseiam numa extração ácida, onde os metais são extraídos da matriz enquanto a amostra é deixada em contato com solução diluída de HNO₃ ou HCl sob ebulição (Skurikhin, 1993).

Kira (2002) avaliou diferentes procedimentos de preparo de amostra (digestão por via seca, digestão por via úmida em chapa elétrica e em forno de micro-ondas) e comparou a digestão parcial com uso de HCl diluído que permitiu a determinação de minerais e traços de elementos (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn) em amostras de leite e produtos lácteos. Os resultados obtidos através da técnica de ICP OES, após os diferentes tratamentos de amostra, foram comparados com os obtidos pela técnica de AANI (análise por ativação com nêutrons), que não requer dissolução da amostra. A digestão parcial com HCl diluído para amostras de leite e

produtos lácteos mostrou-se adequada para a determinação de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn com boa exatidão e repetibilidade.

Os trabalhos mais recentes são feitos em equipamentos mais modernos, como o ICP MS, porém, os métodos de extração são os mesmos utilizados em ICP OES. Fabricius et al. (2014) realizaram um estudo com o objetivo de investigar qual o melhor procedimento de preparação de amostras para ICP MS, utilizando suspensões de Np mais comumente utilizadas (Ag, TiO₂, CeO₂, ZnO, Au). Foram testados os métodos de micro-ondas, acidificação da amostra e injeção direta no equipamento. Especificamente para Ag, utilizou-se a acidificação com HNO₃ (1,4 mL ~ 65%). Em relação a Ag, as amostras acidificadas foram estatisticamente iguais as digeridas em micro-ondas, demonstrando ser melhor que a injeção direta.

Para extrair AgNp (\pm 42 nm) com PVP da carne de frango por ICP OES, Loeschner et al. (2015), utilizaram a digestão enzimática com Proteinase K. A mistura de carne foi colocada no vórtex durante 1 min a 2500 rpm com 5 mL da solução de proteinase K (3 mg/mL de proteinase K em tampão de 50 mM de NH₄HCO₃ amenizando o pH para 7,4, contendo 5 mg/mL de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 0,2 mg/mL de NaN₃). Em trabalho semelhante, Peters et al. (2013) validaram uma metodologia para detecção de AgNp em ICP MS em carne de frango e encontraram resultados satisfatórios.

Com o objetivo de validar uma metodologia para análise de vários minerais em alimentos consumidos pelos Franceses, Millour et al. (2011) utilizaram várias amostras que foram digeridas utilizando um forno de micro-ondas Multiwave 3000, sistema de digestão (Anton-Paar, Courtaboeuf, França). A partir de 0,2 a 0,6 g de amostras alimentares foram pesadas e colocadas com 3 mL de água ultrapura e 3 mL de HNO₃ (67%, v/v) na digestão por micro-ondas. Os mesmos autores citam que a Ag pode ser quantificada com mais precisão por método específico, normalmente utilizando uma mistura de HNO₃ e HCl para estabilizar estes elementos.

Em outro estudo, Zhou et al. (2014) desenvolveram um método rápido e sensível para análise de Ag (I) e AgNp em matrizes complexas em ICP MS. Utilizaram para digestão e determinação total da Ag um sistema de digestão por micro-ondas (CEM Mars 5 Xpress, Matthews, NC) com um procedimento modificado adicionando 3 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ concentrado. Depois de pré-digerido durante pelo menos 2 h, a mistura foi digerida em micro-ondas, obtendo um excelente resultado.

Para análise de leite em ICP MS e ICP OES, são utilizados dois métodos diferentes de preparação de amostras (Khan et al. 2013, 2014). Estes métodos são por micro-ondas, digestão ácida e dissolução alcalina (Kippler et al., 2009). Porém, Mohd-Taufek et al. (2016) fizeram um estudo para adaptar e validar um método usando etilenodiaminotetracético ácido acético (EDTA), solução de amoníaco, isopropanol e Triton X-100 para determinar simultaneamente oligoelementos em 0,2 mL de amostras de leite humano. Porém, usando um simples método de dissolução alcalina, foi demonstrado que o método é preciso, confiável e sensível no relato de Zn, Cu, Se, Mn, I, Fe, Mo e Br no leite materno.

Porém, existem poucos métodos de preparo de amostra e técnicas de análises validadas para detecção e caracterização de Np em alimentos, sendo que o uso do ICP é uma das melhores opções na atualidade (Mattarozzi et al., 2016).

2.6 Uso de AgNp em embalagens e os riscos de migração

A grande demanda por produtos alimentícios industrializados vem fazendo com que as empresas se modernizem e tragam várias inovações para acompanhar o crescimento da demanda. Entre as necessidades da cadeia produtora de alimentos se destacam as embalagens que consigam manter integras as características dos produtos, aumentando o *shelf life*, as características físico-químicas e sensoriais.

Dados recentes apontam que o mercado mundial de embalagens com Np deve crescer de US\$ 6,5 bilhões em 2013 para US\$ 15 bilhões em 2020, crescimento anual estimado de 12,7% (Reuters, 2015).

Uma alternativa promissora para melhorar as embalagens dos alimentos se refere ao uso de Np revestindo ou incorporadas a matriz de polímeros. No Brasil, já existem empresas produzindo este tipo de embalagem para leite. De acordo com a empresa, as AgNp são misturadas na forma de pó na matriz de polietileno para confecção de garrafas para embalagem de leite (FAPESP, 2015).

Porém, existem outros tipos de embalagens com AgNp. Mei et al. (2017) incorporaram clusters de prata (AgNC) (~ 2 nm de diâmetro) em filmes de zeína e relatam que o material de revestimento possui uma potente atividade antimicrobiana, baixa toxicidade para células humanas e baixo potencial para prejudicar o meio ambiente.

Órgãos responsáveis pela liberação de novos produtos nos EUA já aprovaram o uso de AgNp acrescentados em polietileno para uso em embalagens de alimentos. Na Europa, o European Food Safety Authority (EFSA) concluiu que eles são seguros para o consumidor se a migração de íons de Ag não exceder a dose limite de 0,05 mg de Ag/Kg de alimento (EFSA, 2011).

No Brasil, a legislação para embalagens é estipulada pela Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008 é também de 0,05 mg/kg (Anvisa, 2008), acompanhando a legislação Europeia. Portanto, o maior problema do uso destas embalagens contendo AgNp refere-se à possibilidade de migração das Np para o alimento.

Alguns estudos já foram realizados em diversos países e os dados foram contraditórios. Enquanto Von Goetz et al. (2013); Cushen et al. (2014) e Ntim et al. (2015) relataram a presença de migração de AgNp das embalagens para os alimentos, outros autores (Bott et al., 2014; Jokar e Abdul Rahman, 2014; Artiga et al., 2015) não detectaram vestígios de migração das AgNp em seus estudos.

Ntim et al. (2015) demonstraram que concentrações muito pequenas de Ag migram sob a forma de Ag iônica (Ag⁺). Becaro et al., (2015), no entanto, avaliaram o uso de filmes plásticos com AgNp em embalagens de vegetais e não observaram migração. Da mesma forma, Li et al. (2017) não observaram migração de Ag em embalagens revestidas com AgNp em arroz, sendo que a embalagem com AgNp melhorou a qualidade microbiológica e físico-química do arroz.

Portanto, os resultados de vários estudos com AgNp não são conclusivos. Quase todos os estudos congruentes descrevem que a migração é mais alta em um meio ácido, mas os achados são bastante contraditórios (Stormer et al., 2017).

2.7 Referências Bibliográficas

AKRAM, F. E.; EL- TAYEB, T.; ABOU- AISHA, K.; EL- AZIZI, M. A combination of silver nanoparticles and visible blue light enhances the antibacterial efficacy of ineffective antibiotics against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.15, n.48, p.1-13, 2016.

AMARO-LÓPEZ, M.A.; MORENO-ROJAS, R.; SANCHEZ-SEGARRA, P.J.; ZURERACOSANO, G. Tratamiento de las matrices lácteas para la determinación de trazas metálicas por absorción atómica. **Alimentaria**, p. 71-78, 1996.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em 28 de janeiro de 2018.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008. **Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Lista Positiva de Aditivos para Materiais Plásticos destinados à Elaboração de Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos**, 2008.

ARAI, Y.; MIYAYAMA, T.; HIRANO, S. Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages. **Toxicology**, n.328, p. 84–92, 2015.

ARTIAGA, G., RAMOS, K., RAMOS, L., C. AMARA, C., GOMEZ-GOMEZ, M. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS. **Food Chemistry**, v.166, p.76-85, 2015.

ASHARANI, P. V.; WU, Y. L.; GONG, Z.; VALIYAVEETIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19, p. 255102, 2008.

AUSTIN, C. A.; UMBREIT, T. H.; BROWN, K. M.; BARBER, D. S.; DAIR, B. J.; FRANCKE-CARROLL, S.; FESWICK, A.; SAINT-LOUIS, M. A.; HIKAWA, H.; SIEBEIN, K. N.; GOERING, P.L. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. **Nanotoxicology**, v.6, p.912–922, 2012.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 21–37, 2003.

BASMAJI, P. Risco do uso de nanopartículas de prata sobre os seres humanos: Toxicidade da prata e seus Efeitos sobre a Saúde. **Centro de pesquisa e desenvolvimento biotecnológico inovatecs**, 2013.

BBC. **Por que o uso de antibióticos na criação de animais ameaça à saúde humana**. Disponível em: http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/12/151208_antibioticos_animais_rb). Acesso em: 21 de Julho de 2017.

BECARO, A. A.; PUTI, F. C.; PANOSSO, A. R.; GERN, J. C.; BRANDÃO, H. M.; CORREA, D. S.; FERREIRA, M. C. Postharvest Quality of Fresh-Cut Carrots Packaged in Plastic Films Containing Silver Nanoparticles. **Food Bioprocess Technology**, 2015.

BOONSTRA, J.; POST, J.A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v.337, p.1–13, 2004.

BOTT, J., STORMER, A., FRANZ, R. Migration of nanoparticles from plastic packaging materials containing carbon black into foodstuffs. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v.31, p.1769-1782, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em 14 de setembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2011a. 72 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 14 de Agosto de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011b. 227 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 16 de Agosto de 2016.

BRENNER, I. B.; ZANDER, A.; COLE, M.; WISEMAM, A. Comparison of axially and radially viewed inductively coupled plasmas for multi-element analysis: Effect of sodium and calcium. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.12, p.897-906, 1997.

BRAEM, G.; VLIEGHER, S.; VERBIST, B.; PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; DE VUYST, L.; LEROY, F. Unraveling the microbiota of teat apices of clinically healthy lactating dairy cows, with special emphasis on coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1499-1510, 2013.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 129-135, 1999.

CASTANHEIRA, R. G. **Nanopartículas bioadesivas para administração intramamária: desenvolvimento, caracterização físico-química, cinética de liberação e avaliação biológica in vivo**. 2012. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends Biotechnology**, v.28, p.580–588, 2010.

CHANGKANG, P.; GUANGXUAN, Z.; BROWNER, R. Role of auxiliary gas flow in organic sample introduction with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.7, p.1231-1237, 1992.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H.J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v.176, p.1–12, 2008.

COSTA, E. O.; GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B. Proporção da ocorrência de mastite clínica em relação à subclínica correlacionada aos principais Agentes Etiológicos. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v.4, p.10-13, 2001.

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PEREIRA, U. P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Instituto de Biologia**, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região Sul do Estado de Minas Gerais**. 2008. 123 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, G. M., PEREIRA, U.P., FIGUEIREDO, D.J., SILVA, N. Estimativas de queda na produção de leite em função das contagens de células somáticas no leite do tanque em rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais. **Revista Veterinária e Zootecnia – Minas**, v.109, p.29-34, 2011.

CRAVEN, N., ANDERSON, J.C. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 513-523. 1984.

CUSHEN, M., KERRY, J., MORRIS, M., CRUZ-ROMERO, M., CUMMINS, E. Evaluation and simulation of silver and copper nanoparticle migration from polyethylene nanocomposites to food and an associated exposure assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.1403-1411, 2014.

DAKAL, T. C.; KUMAR, A.; MAJUMDAR, R. S.; YADAV, V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v.16, n.7, p.1831, 2016.

DAMM, C.; MUNSTEDT, H.; ROSCH, A. Long-term antimicrobial polyamide/silver-nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 6067-6073, 2007.

DEHKORDI, S. H; HOSSEINPOUR, F.; KAHRIZANGI, A. E. An *in vitro* evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.52, p. 10795-10797, 2011.

DE MATTEIS, V.; MALVINDI, M. A.; GALEONE, A.; BRUNETTI, V.; DE LUCA, E.; KOTE, S.; KSHIRSAGAR, P.; SABELLA, S.; BARDI, G.; POMPA, P. P. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of Ag⁺ ion release in the cytosol. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.11, p.731–739, 2015.

DEPARTMENT FOOD AND DRUG ADMINISTRATION of HEALTH and HUMAN SERVICES, Federal Register. **Over-the-Counter Drug Products Containing Colloidal Silver ingredients or Silver Salts**. v. 61, n. 200, 1996.

DEPARTMENT FOOD AND DRUG ADMINISTRATION of HEALTH and HUMAN SERVICES, Federal Register. **Over-the-Counter Drug Products Containing Colloidal Silver ingredients or Silver Salts**. v. 64, n. 158, 1999.

DEPARTMENT FOOD AND DRUG ADMINISTRATION of HEALTH and HUMAN SERVICES, Fiscal Year 2015, **Justification of Estimates for Appropriations Committees**. Disponível em: www.fda.gov/downloads/aboutfda/reportsmanualsforms/reports/budgetreports/ucm388309.pdf - Acesso em: 03 de fevereiro de 2015.

DOWLING, D.P.; BETTS A.J.; POPE C.; MCCONNELL, M.L.; ELOY R.; ARNAUD, M.N. Anti-bacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum. **Surface and Coatings Technology**, v.163-164, p.637- 640, 2003.

DRAKE P.L., HAZELWOOD K.J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. **Annals of Occupational Hygiene**, v.49, p.575-585, 2005.

DURÁN, N.; DURÁN, M.; BISPO, J. B.; SEABRA, A.B.; FÁVARO, W. J.; NAKAZATO, G. Silver Nanoparticles: A New View on Mechanistic Aspects on Antimicrobial Activity, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 2015.

DURAN, N.; MARCATO, P. D.; ALVES, O. L.; SOUZA, G. I. H.; ESPOSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v.3, n.8, 2005.

EC - Commission decision 2002/657/EC of 12 august 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Union**: L221, p. 8-36, 2002.

EFSA Scientific Committee. Scientific opinion on guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. **EFSA Journal**, v.9, n.5, 2011.

EPA - Environmental Protection Agency-USA (1987). **Integrated Risk Information System**. Silver (CASRN 7440-22-4) 1987). Disponível em: www.epa.gov. Acesso em: 11 de março de 2015.

EURACHEM Guide: **The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods**. Eurachem LGC, Teddington, 1998.

FABRICIUS, A. L.; DUESTER, L.; MEERMANN, B.; TERNES, T. A. ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles—sample preparation and off-line fractionation strategies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, p.467-479, 2014.

FAPESP. **Empresa paulista dobra prazo de validade de leite fresco pasteurizado**, 2015. Disponível em: http://agencia.fapesp.br/empresa_paulista_dobra_prazo_de_validade_de_leite_fresco_pasteurizado/21325/. Acesso em: 15 de outubro de 2017.

FAYAZ, A.M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R.; KALAICHELVAN, P.T.; ENKETESAN, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, n.1, p.103-109, 2010.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, p.662-668, 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics - Guidance for Industry**, 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Acesso em: 12 de setembro de 2016.

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

FURLANETO, F. P. B. NANOTECNOLOGIA NO SETOR AGROPECUÁRIO. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 69, 2011.

GAILLET, S.; ROUANET, J. M. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.77, p. 58–63, 2015.

GASPARICS, T.; MARTINEZ, R. M. G.; CAROLI, S.; ZARAY, G. Determination of trace elements in Antarctic Krill samples by inductively coupled atomic emission and graphite furnace absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v.67, p.1-3, 2000.

GAVILANES, K. P. V. **Estudio de la actividad antimicrobiana de nano plata sobre mastites subclínica bovina em la Unidad Productiva Tunsh**". Tese Doutorado apresentada a Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Faculdade de Ciências. Escola de Bioquímica Y Farmácia. Para obtenção do Título de Doutor em Bioquímico Farmacêutico, 2010.

GOGOI, S. K.; GOPINATH, P.; PAUL, A.; RAMESH, A.; GHOSH, S. S.; CHATTOPADHYAY, A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 22, p. 9322-9328, 2006.

GOTTSCHALK, F.; SCHOLZ, R. W.; NOWACK, B. Probabilistic material flow modeling for assessing the environmental exposure to compounds: Methodology and an application to engineered nano-TiO₂ particles. **Environmental Modeling Software**, v.25, p.320–332, 2010.

GRAY, J. E.; NORTON, P. R.; ALNOUNO, R.; MAROLDA, C. L.; VALVANO, M. A.; GRIFFITHS, K. Biological efficacy of electroless-deposited silver on plasma activated polyurethane. **Biomaterials**, v. 24, p. 2759-2765, 2003.

GRUET, P., P. MAINCENT., BERTHELOT, X., KALTSATOS, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 245-259, 2001.

GURUNATHAN, S. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.29, p.217–226, 2015.

HOENING, M.; KERSABIEC, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochim Acta, Part B**, v. 51, p. 1297-1307, 1996.

HOENING, M. Preparation steps in environmental trace elements analysis-facts and traps. **Talanta**, v. 54, p. 1021-1038, 2001.

HUANG, X.; BAO, X.; LIU, Y.; WANG, Z.; HU, Q. Catechol-Functional Chitosan/Silver Nanoparticle Composite as a Highly Effective Antibacterial Agent with Species-Specific Mechanisms. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.1860, 2017.

HUNTA, P. R.; MARQUISB, B. J.; TYNERC, K. M.; CONKLIND, S.; OLEJNIKA, N.; NELSONB, B. C.; SPRANDOA, R. L. Nanosilver suppresses growth and induces oxidative damage to DNA in *Caenorhabditis Elegans*. **Journal of Applied Toxicology**, v.33, p.1131–1142, 2013.

ICH. **Guidance for Industry. Q2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996. Acesso em 27 de Julho de 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2 (R1)**, 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>. Acesso em 27 de Julho de 2015.

ICH: **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q 2 (R1)**. ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

ICP – OES Analyses. 30V8. **Standard Operating Procedure n. 30. Questa Rock Pile Stability Study**. Editorial SKA, 2008. Disponível em: https://geoinfo.nmt.edu/.../SOP_30v8_ICP_OES_fin. Acesso em 28 de Agosto de 2015.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDÚSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ – CGCRE – 008), Revisão 05**, 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2005), **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories; ISO/IEC 17025**. European Committee for Standardization, Brussels, 2005.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025**, 1999.

IVASK, A.; ELBADAWY, A.; KAWEETEERAWAT, C.; BOREN, D.; FISCHER, H.; JI, Z.; CHANG, C. H.; LIU, R.; TOLAYMAT, T.; TELESKA, D.; ZINK, J. I.; COHEN, Y.; HOLDEN, P. A.; GODWIN, H. A. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. **ACS Nano**, v.8, n.1, p.374–386, 2013.

JAMARAN, S.; ZARIF, B.R. Synergistic Effect of Silver Nanoparticles with Neomycin or Gentamicin Antibiotics on Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus*. **Open Journal of Ecology**, v.6, p.452-459, 2016.

JOKAR, M.; ABDUL RAHMAN, R. Study of silver ion migration from meltblended and layered-deposited silver polyethylene nanocomposite into food simulants and apple juice. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.31, p.734-742, 2014.

JUBERG, D.R.; HEARNE, F.T. **Silver and gold**. In Bingham E, Cohrssen B, Powell CH, editors. *Patty's toxicology*, 5th edn. New York: John Wiley & Sons, 2001.

KHAN, N.; JEONG, I.; HWANG, I.; KIM J.S.; CHOI, S.H.; NHO, E.; CHOI, J.; KWAK, B.M.; AHN, J.H.; YOON, T.; KIM, K.S. Method validation for simultaneous determination of chromium, molybdenum and selenium in infant formulas by ICP-OES and ICP-MS. **Food Chemistry**, v.141, n.4, p.3566–3570, 2013.

KHAN, N.; JEONG, I.S.; HWANG, I.M.; KIM, J.S.; CHOI, S.H.; NHO, E.Y.; CHOI, J.Y.; PARK, K.S.; KIM, K.S. Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). **Food Chemistry**, v.147, p. 220–224, 2014.

KIM, H.R.; KIM, M.J.; LEE, S.Y.; OH, S.M.; CHUNG, K.H. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental**, v.726, p.129–135, 2011.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H. J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.Y.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.3, n.1, p.95-101, 2007.

KIPPLER, M.; LONNERDAL, B.; GOESSLER, W.; EKSTROM, E.C.; ARIFEEN, S.E.; VAHTER, M. Cadmium interacts with the transport of essential micronutrients in the mammary gland - a study in rural Bangladeshi women. **Toxicology**, v. 4, n. 257 (1–2), p.64–69, 2009

KIRA, C. S. **Estudo da composição mineral e dos elementos-traço essenciais em amostras de leite e produtos lácteos por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido e análise por ativação com nêutrons**. 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de

Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

KLEIN, D.A. Editor. **Effects on humans**. In Environmental impacts of artificial ice nucleating agents. Stroudsburg, Dowden, Hutchinson, and Ross, p.169–175, 1978.

KUMAR, T. V. C.; MURALIDHAR, Y.; PRASAD, P. E.; PRASAD, T. N. V. K. V.; RAJ, A. Evaluation of therapeutic potential of nanosilver particles synthesized using Aloín in experimental murine mastitis model. **IET Journal**, 2013. Disponível em: <http://www.ietdl.org>. Acesso em: 14 de Abril de 2014.

LAGARÓN, J.M.; OCIO, M. J.; RUBIO, A. L. Editors. **Antimicrobial Polymer**. Chapter 11 - Silver and nanosilver based plastic technologies. Antonio Marínez Abad. Wiley – New Jersey, p. 287-316, 2012.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LANDSDOWN, A.B.G. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal of Wound Care**, v.11, p.125–138, 2002.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N. de; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.36-40, 2011.

LANSDOWN, A. B.G. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology**, v. 33, p. 17-34, 2006.

LEE, Y.; CHOI, J.; KIM, P.; CHOI, K.; KIM, S.; SHON, W. A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring. **Toxicology Research**, v.28, p.139–141, 2012.

LEM, K.W.; CHOUDHURY, A.; LAKHANI, A.A.; KUYATE, P.; HAW, J.R.; LEE, D.S.; IQBAL, Z.; BRUMLIK, C.J. Use of Nanosilver in Consumer Products. **Recent Patents on Nanotechnology**, n.6, v.1, p.60-72, 2012.

LI, L.; ZHAO, C.; ZHANG, Y.; YAO, J.; YANG, W.; HU, O. WANG, C.; CAO, C. Effect of stable antimicrobial nano-silver packaging on inhibiting mildew and in storage of rice. **Food Chemistry**, v.215, p.477–482, 2017.

LIMBACH, L. K.; WICK, P.; MANSER, P.; GRASS, R. N.; BRUININK, A.; STARK, W. J. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 4158-4163, 2007.

LIU, J.; HURT, R.H. Ion release and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environment Science and Technology**, v. 44, p. 2169-2175, 2010.

- LIU, J.; SONSHINE, D.A.; SHERVANI, S.; HURT, R.H. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. **ACS Nano**, v.4, p.6903–6913, 2010.
- LOESCHNER, K., NAVRATILOVA, J., GROMBE, R., LINSINGER, T.P.J., KØBLER, C., MØLHAVE, K., LARSEN, E.H. In-house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, 2015.
- LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, R.; HE, Q.Y.; YU, W.Y.; SUN, H. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v.5, n.4, p.916-924, 2006.
- LOK, C-N.; HO, C-M.; CHEN, R.; HE, Q-Y.; YU, W-Y.; SUN, H.; TAM, P K-H.; CHIU, J-F.; C, C-M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 527-534, 2007.
- LOMER, M.C.; THOMPSON, R.P.; POWELL, J.J. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.61, p.123–130, 2002.
- LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; ROCHA, C.M.B.M.; COSTA, G. M.; FRANCO NETO, A.; SANTOS, G. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v.79, n.4, p.477-483, 2012
- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agrícola**, v.57, n.2, p.359-361, 2000.
- MANEEWATTANAPINYO, P.; BANLUNARA, W.; THAMMACHAROEN, C.; EKGASIT, S.; KAEWAMATAWONG, T. An Evaluation of Acute Toxicity of Colloidal Silver Nanoparticles. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.73, n.11, p.1417–1423, 2011.
- MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E.M.V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **The Journal of Nanoparticle Research**, v.12, n.5, p.1531-1551, 2010.
- MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZGUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J.R.; FACUNDO, R. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 10, p. 1343-1348, 2008.
- MASSON, P.; ORIGNAC, D.; VIVES, A.; PRUNET, T. Matrix effects during trace elements analysis in plant samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with axial view configuration and ultrasonic nebulizer. **Analisis**, v.27, p.813-820, 1999.
- MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.7, p.4278-4281, 2003.

MEI, L.; TENG, Z.; ZHU, G.; LIU, Y.; ZHANG, F.; ZHANG, J.; LI, Y.; GUAN, Y.; LUO, Y.; CHEN, X.; WANG, Q. Silver nanocluster-embedded zein films as antimicrobial coating materials for food packaging. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 2017.

MELLO, P.L.; AGOSTINIS, R.O.; BARZON, E.M.; MELLO, P. L.; AGOSTINIS, R. O.; BARZON, E. M.; COLOMBO, R. B.; SILVA, A. V.; MARTINS, L. A. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do Paraná. **Veterinaria e Zootecnia**, v.19, n.4, p.513- 519, 2012.

MERMET, J. M.; POUSSEL, E. ICP Emission Spectrometers: 1995 Analytical Figures of Merit. **Applied Spectroscopy**, v.49, n.10, 1995.

METHOD 6010 B, **Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry CD-ROM 6010B - 2 Revision 2**, 1996.

MILLOUR, S.; NOE, L.; KADAR, A.; CHEKRI, R.; VASTEL, C.; GUÉRIN, T. Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, p.111-120, 2011.

MOHD-TAUFEK, N.; CARTWRIGHT, D.; VIES, M.; HEWAVITHARANA, A. K.; KOORTS, P.; SHAW, P. N.; SUMNER, R.; LEE, E.; WHITFIELD, K. The Simultaneous Analysis of Eight Essential Trace Elements in Human Milk by ICP-MS. **Food Analytical Methods**, v.9, p.2068-2075, 2016.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346- 2353, 2005.

MORONES-RAMIREZ, J. R.; WINKLER, J. A.; SPINA, C. S.; COLLINS, J. J. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 190, p. 1-11, 2013.

MOSQUEIRA, V. C. F.; ARAÚJO, R. S.; BRANDÃO, H. M. Nanoparticulate composition containing antibiotics for intramammary administration in animal. United States. **Patent Application Publication**, 2013.

MOSQUEIRA, V.C.F.; BRANDÃO, H.M.; ARAUJO, R. S. PI 1002601-0: **Composição nanoestruturada de uso veterinário para administração de fármacos**. 2010.

MUDALIGE, T. K.; LINDER, S. W. Development of Screening Methodologies for the Detection of Nanoscale Silver in FDA Regulated Food Products Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). U.S. **Food and Drug Administration**, 2013.

MUKHERJEE, S. G.; O'CLAONADH, N.; CASEY, A.; CHAMBERS, G. Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. **Toxicology in Vitro**, v.26, n.2, p.238-251, 2012.

MURRAY, R. G. E.; STEED, P.; ELSON, H. E. The location of the mucopeptide in sections of the cell wall of *Escherichia Coli* and other Gram-negative bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, v.11, p. 547-560, 1965.

NATA. Technical Note 17: **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. National Association of Testing Authorities, Australia, 2013.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current Concepts of bovine mastitis**. 3. ed. 1987.

NATZKE, R. P. Elements of Mastitis Control. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1431-1442, 1971.

NAWAZ, M.; HAN, M. Y.; KIM, T.; MANZOOR, U.; AMIN, M. T. Silver disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* in rooftop-harvested rainwater for potable purposes. **Science of the Total Environment**, v.431, p. 20-25, 2012.

NEFZGER, M.; KREUTER, J.; VOGES, R.; LIEHL, E.; CZOK, R. Distribution and elimination of polymethyl methacrylate nanoparticles after peroral administration to rats. **Journal of Pharmacy Science**, v.73, p.1309–1311, 1984.

NETO, E. A. B., RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Comunicado Técnico**, São Carlos-SP, 2008.

NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health. **Approaches to Safe Nanotechnology Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials**. NIOSH Publication No. 2009-125, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2009-125>. Acesso em: 16 de outubro de 2015.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. **Environmental Science Technology**, v.45, p.1177–1183, 2011.

NTIM, A.S.; THOMAS, T. A.; BEGLEY, T. H.; NOONAN, G. O. Characterization and potential migration of silver nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials. **Food Additives & Contaminants: A**, v.32, n.6, p.1003-1011, 2015.

OLIANI, W. L. **Estudo da formação de nanogéis e microgéis de polipropileno modificado por radiação gama e incorporação de nanopartículas de prata visando à ação biocida**. Tese Doutorado em Ciências, área de Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PAL, S.; TAK, Y.K.; SONG, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.27, n.6, p.1712–1720, 2007.

PARK, K.; PARK, E.-J.; CHUN, I.K.; CHOI, K.; LEE, S.H.; YOON, J. Bioavailability and Toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. **Archives of Pharmacal Research**, v.34, p.153–158, 2011.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v.33, n.2, p.421-430, 2010.

PAULSON, J. A.; ZAOUTIS, T. E. Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics. **Pediatrics**, v.136, n.6, 2015.

PEDRO, N. A. R. **Determinação de nutrientes minerais em alguns alimentos por ICP-AES**. 1998. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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

PESSOTO, A. G. **Efeitos de nanopartículas de prata e pesticidas organoclorados em macrófagos peritoneais de camundongo**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, 2013.

PETERS, R. J. B.; RIVERA, Z. H.; VAN BEMMEL, G.; MARVIN, H. G. J.; WEIGEL, S.; BOUWMEESTER, H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2013.

PHALEN, R.F.; MORROW, P.E. Experimental inhalation of metallic silver. **Health Physiology**, v.24, p.509–518, 1973.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra mastite**. São Paulo: Milkbizz, 2002.

RAI, M. K.; YAKA, A.; GADE, A.K. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, p.76-83, 2009.

RAIMONDI, F.; SCHERER, G.G.; KOTZ, R.; WOKAUN, A. Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v.44, p.2190–2199, 2005.

RATTE, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 18, p. 89-108, 1999.

REUTERS. Persistence market Research: Global nano-enabled packaging market to reach US\$15.0 billion by 2020. **In Thomson Reuters**, 2015.

RUEGG, P.L. Investigation of mastitis problems on farms. **The Veterinary Clinics of North America**, v.19, p.47-63, 2003.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE. In: Adam PF, Peter AL, Jean-Yves M, editors. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 4th ed. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing. v. 61, p.304-305, 2004.

RYAN, A. **Direct analysis of milk powder on the Liberty Series II ICP – AES with the axially-viewed plasma, ICP – 21 (variant)**, P.1-7, 1997.

SAMBHY, V.; MACBRIDE, M. M.; PETERSON, B. R.; SEN, A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: Dual action tunable antimicrobial materials. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 9798-9808, 2006.

SANDRONI, V; SMITH, C.M.M. Microwave digestion of sludge, soil and sediment samples for metal analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.468, p. 335-344, 2002.

SANTANA, S. V. **Nanopartículas de prata e Ag/Zn⁰ nanoestruturado como agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de micro-ondas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de mestre em Química, 2012.

SANTOS, M. V. Controle da mastite ambiental. **Mundo do Leite**, v.10, n. 56, p. 16-21, 2012.

SARKAR, A.; GHOSH, M.; CHANDRA SIL, P. Nanotoxicity: oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. **Journal of Nanoscience Nanotechnology**, v.14, p.730–743, 2014.

SCENIHR - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. **Opinion on Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance**, 2014. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/policy/index_en.htm. Acesso em: 05 de novembro de 2015.

SCHROEDER, J. W. Bovine Mastitis and Milking Management. **Mastitis Control Programs. AS1129 (Revised)**, 2012.

SEONG, M.; LEE, D.G. Silver Nanoparticles against *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium*: Role of Inner Membrane Dysfunction. **Current Microbiology**, v.74, n.6, p.661-670, 2017.

SERGENT, M. **Statistical design: Chemometrics**, number 25 of the series, Data handling in science and technology', R. E. Bruns, I. S. Scarminio and B. de Barros Neto, Elsevier, Amsterdam, 2006.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T; ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, p. 1-9, 2007.

SHOCKMAN, G. D.; BARRET, J. F. Structure, Function, and Assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.37, p. 501-527, 1983.

SILVA, J. C. J. **Determinação direta de constituintes inorgânicos em leite por ICP OES: comparação crítica do desempenho analítico em configuração de tocha axial e radial, usando uma mistura de aminas terciárias (CFA-C) como solvente**. 2004. 152 f. (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para a Saúde Animal, 2017. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>. Acesso em: 21 de Julho de 2017.

SKURIKHIN, I. M. Methods of analysis for toxic elements in foods. Part IV. General method of ashing for the determination of toxic elements. **Journal Association of Official Analytical Chemists International**, v.76, n.2, p. 257-262, 1993.

SMETANA, A. B.; KLABUNDE, K. J.; MARCHIN, G.R.; SORENSEN, C.M. Biocidal Activity of Nanocrystalline Silver Powders and Particles. **Langmuir**, v. 24, p.7457-7464, 2008.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.275, n.1, p.177-182, 2004.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p. 25-35, 2005.

SU, H. L.; CHOU, C.C.; HUNG, D.J.; LIN, S.H.; PAO, I.C.; LIN, J.H.; HUANG, F.L.; DONG, R.X. LIN, J.J. The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. **Biomaterials**, v. 30, p.5979–5987, 2009.

STORMER, A.; BOTT, J.; KEMMER, D.; FRANZ, R. Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics. **Trends in Food Science & Technology**, v.63, p.39-50. 2017.

TANG, J.; XIONG, L.; ZHOU, G.; WANG, S.; WANG, J.; LIU, L.; JIAGE, LI.; YUAN, F.; LU, S.; WAN, Z.; CHOU, L.; XI, T. Silver nanoparticles crossing through and distribution in the blood–brain barrier in vitro. **Journal of Nanoscience Nanotechnology**, v.10, p. 6313–6317, 2010.

TEIXEIRA, S. **Os perigos dos metais pesados**. Disponível em: <http://www.velhosamigos.com.br/autores/teixeira/teixeira5.html>. Acesso em: 04 de novembro de 2015.

THE SILVER INSTITUTE: **The future demand of silver: industrial demand**. The Silver Institute, Washington (DC) USA, v.27, 2011. p.32.

TSIOLA, A.; PITTA, P.; CALLOL, A. J.; KAGIORGI, M.; KALANTZI, I.; MYLONA, K.; SANTI, L.; TONCELLI, C.; PERGANTIS, S.; TSAPAKIS, M. The impact of silver nanoparticles on marine plankton dynamics: Dependence on coating, size and concentration. **Science of the Total Environment**, v.601–602, p.1838–1848, 2017.

TOZZETTI, D.S., BATAIER, M.N., ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, p.1-7, 2008.

VAN DER ZANDE, M.; VANDEBRIEL, R.J.; VAN DOREN, E.; KRAMER, E.; RIVERA, Z.H.; SERRANO-ROJERO, C.S. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. **ACS Nano**, v.6, p.7427–7442, 2012.

VILA, A., SANCHEZ, A., TOBIO, M., CALVO, P., ALONSO, M.J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, p.15-24, 2002.

VIMBELA, G. V.; NGO, S. M.; FRAZE, C.; YANG, L.; STOUT, D. A. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.3941–3965, 2017.

VIM - **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012)**, 1ª Edição Luso Brasileira, Duque de Caxias, INMETRO, 2012.

VASSIO, C.; DA AGÜEROA, D. A.; RASPANTIB, C. G.; ODIERNOB, L. M.; LARRIESTRAA, A. J. Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy farms in Córdoba, Argentina. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 47, n. 1, p.7-14, 2015.

VON GOETZ, N., FABRICIUS, L., GLAUS, R., WEITBRECHT, V., GUNTHER, D., HUNGERBUHLER, K. Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v.30, p.612-620, 2013.

XIU, Z.M.; MA, J.; ALVAREZ, P.J.J. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 9003-9008, 2011.

XIU, Z.M.; ZHANG, Q.B.; PUPPALA, H.L.; COLVIN, V.L.; ALVAREZ, P.J.J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v.12, p.4271-4275, 2012.

WEI, L.; LU, J.; XU, H.; PATEL, A.; CHEN, Z.; CHEN, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v.20, n.5, p.595-601, 2015.

WEN, H.; DAN, M.; YANG, Y.; LYU, J.; SHAO, A.; CHENG, X.; CHEN, L.; XU, L. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. **PLoS ONE**, v.12, n.9, 2017.

WERNICKI, A.; PUCHALSKI, A.; URBAN-CHMIEL, R.; DEC, M.; STĘGIERSKA, D.; DUDZIC, A.; WÓJCIK, A. Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. **Medycyna Weterynaryjna**, v.70, n.9, p.564-567, 2014.

WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver Nanoparticles – The Real “Silver Bullet” in Clinical medicine? **Medicinal Chemistry Research**, v.1, p.125-131, 2010.

WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTER FOR SCHOLARS (WWICS) Project on emerging nanotechnologies. In: http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/, 2011.

YAH, C.S.; SIMATE, G.S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.43, 2015.

YEO, S.Y.; LEE, H.J.; JEONG, S.H. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. **Journal Materials Science**, v.38, n.10, p.2143-2147, 2003.

YUAN, Y.; PENG, O.; GURUNATHAN, S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.569, 2017.

ZHANG, T.; WANG, L.; CHEN, Q.; CHEN, C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. **Yonsei Medical Journal**, v.55, p.283–291, 2014.

ZHANG, X. F.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.10, p.1603; 2016.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. **Journal of Animal Science**, v.86, 2008 (Suppl. 1) p.57–65. Publicado em 5 de dezembro de 2014

ZHU, Y.; ZHAO, Q.; LI, Y.; CAI X.; LI, W. The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylynychia mytilus*. **Journal for Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, p.1357–1364, 2006.

ZHOU, X. X.; LIU, R.; LIU, J. F. Rapid Chromatographic Separation of Dissoluble Ag(I) and Silver- Containing Nanoparticles of 1–100 Nanometer in Antibacterial Products and Environmental Waters. **Environment Science Technology**, v.48, p. 14516–14524, 2014.

3 HIPÓTESE

A administração intramamária de AgNp é eficiente no tratamento da mastite bovina por *S. aureus* e não gera resíduos nos tecidos e no leite das vacas tratadas.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia de uma formulação de AgNp no tratamento de vacas contra mastite por *S. aureus* e mensurar resíduos de Ag no leite e em tecidos dos animais.

2.8 Objetivos específicos

Determinar a MIC (Concentração inibitória mínima) das AgNp contra *S. aureus*.

Validar uma metodologia de análises de prata no ICP- OES para detectar Ag no leite, músculo, fígado e rim de bovinos.

Avaliar a eficácia das AgNp no tratamento de mastite por *S. aureus* e verificar a presença de resíduos de prata no leite e tecidos dos animais tratados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1: Caracterização e Estudos *in vitro* de Nanopartículas de Prata (AgNp)

1 Introdução

O processo de adaptação aos estímulos abióticos é inerente a toda espécie para tentar se perpetuar em um ecossistema (Deléage, 1993). Em um contexto de biologia evolutiva, o incremento do estresse abiótico pode acarretar a extinção ou adaptação de uma determinada população (Forattini, 1998). Transpondo este conceito para bactérias patogênicas, os antimicrobianos talvez sejam os mais importantes fatores abióticos intencionalmente utilizados pelos seres humanos para controlar o livre crescimento destes microrganismos. Com isso, desde a descoberta da penicilina e seu uso pelo Dr. J. C. Kakavas no tratamento da primeira vaca contra a mastite em 1944 (Gingerich, 1984), seres humanos e bactérias travam uma intensa disputa em relação a colonização do interior da glândula mamária. Desde então, ao longo dos anos, para cada nova base farmacêutica utilizada para o controle e prevenção da mastite, uma população de bactérias resistentes foi selecionada (Levin et al., 2000).

Nas últimas décadas, o custo de desenvolvimento de novas moléculas tem restringido o lançamento de novos antimicrobianos para controle bacteriano (Adams e Brantner, 2006). Em paralelo, tem-se observado um crescimento no consumo mundial de antimicrobianos, tanto em humanos (Woolhouse et al., 2015), quanto em animais (Thomas et al., 2015). Destaca-se, ainda, que na área animal, em decorrência da crescente demanda por alimentos, intensificação de produção e restrição de novas fronteiras agrícolas, estima-se que o consumo mundial de antimicrobianos aumentará em 60% e, no Brasil, ele dobrará até 2030 (BBC, 2015). Dentro do conceito de saúde única, esse fenômeno mundial foi intimamente relacionado ao aumento da pressão de seleção bacteriana e, por consequência, está ligado a surtos de bactérias multirresistentes (Rai et al., 2009; Paulson e Zaoutis, 2015). Esse fato estimulou a Organização Mundial de Saúde, em 2017, a clamar para a comunidade científica o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Pires et al., 2017).

Considerando esse contexto, o uso de substâncias com potencial antimicrobiano para controlar bactérias multirresistentes ou para associar com antimicrobianos já existentes, visando aumentar a eficiência do tratamento, pode ser uma maneira paliativa a falta de novas moléculas. Entre esses compostos podem-se citar os sais de prata que possuem atividade antimicrobiana reconhecida desde a antiguidade (Nowack et al., 2011). Atualmente, as AgNp vêm ganhando atenção para incorporação em produtos de uso cotidiano ou mesmo em medicamentos (Chen et al., 2008), graças à sua ação microbiana superior à dos sais de prata (Cavassin et al., 2015). Em um estudo recente, Katarzyna et al. (2017) avaliaram a eficiência das AgNp contra bactérias do gênero *Staphylococcus* coletadas no ar e os resultados demonstraram fortes propriedades antibacterianas. Contudo, previamente ao uso terapêutico da AgNp, são necessários estudos para medir sua atividade antimicrobiana e eventuais efeitos citotóxicos.

O Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) preconiza o uso dos métodos de difusão em disco ou o de diluição seriada para determinar a susceptibilidade de bactérias frente a um farmoquímico (CLSI, 2013). Entretanto, Np podem apresentar comportamentos diferentes daqueles observados nas partículas de tamanhos maiores nos testes empregados para avaliação da atividade antimicrobiana.

Comparando os métodos preconizados pelo CLSI na avaliação de diferentes tipos de AgNp, Cavassin et al. (2015) observaram maior variação de resultados no método de difusão, o que levou os autores a propor a difusão em disco como um método de triagem para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de AgNp e o uso do método de diluição seriada como o de referência. Utilizando a técnica de difusão em disco, Cho et al. (2005) relataram MICs de AgNp em caldo Luria-Bertani (LB) de 7,5 µg/mL e 12,5 µg/mL para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente. Sadeghi et al. (2012), empregando técnica semelhante, encontraram MIC de 5 ppm para *S. aureus* e 10 ppm para *E. coli*.

Para *S. aureus*, tanto o caldo quanto o ágar Mueller-Hinton (MH) são os meios para crescimento bacteriano eletivos em ambos os métodos de susceptibilidade para determinação do MIC (CLSI, 2013a). No uso de AgNP contra *S. aureus* isolados de casos clínicos de mastite caprina obteve-se um valor de MIC igual a 2 µg/mL, quando avaliado em caldo MH (Yuan et al., 2017). Por outro lado, Dehkordi et al. (2011) utilizaram o caldo de soja tripticaseína (TSB) para determinar o MIC de *S. aureus* isolados de casos mastite bovina e obtiveram valores entre 1,25 e 10 µg/mL.

Poucos estudos usaram o MIC para avaliar o efeito antibacteriano de AgNp (Cavassin et al., 2015). Considerando-se ainda que o efeito de AgNp sobre as bactérias pode variar de acordo com o método *in vitro* usado nessa avaliação (Cavassin et al, 2015), torna-se muito importante o estudo do comportamento dessas Np e suas possíveis variações estruturais e de atividade inibitória em diferentes meios de cultura. Portanto, o objetivo principal deste capítulo é avaliar a eficiência de AgNp contra as principais amostras de *S. aureus* isolados de rebanhos leiteiros de Minas Gerais, utilizando-se diferentes tipos de meio de cultura para os testes de MIC.

2 Material e Métodos

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG) com amostras comerciais de AgNP (Sigma-Aldrich, cat. n° 576832 - Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de tamanho médio de 100 nm. Foram utilizados dois lotes diferentes de nanopartículas, ambos identificados com o mesmo número, mas um contendo o dispersante PVP (polivinilpirrolidona) que estabiliza as partículas e o outro sem PVP. As amostras foram manipuladas da mesma maneira, contudo, algumas análises foram realizadas apenas nas amostras sem PVP.

A escolha das AgNp (Sigma-Aldrich, cat. n° 576832- Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de tamanho médio de 100 nm para o trabalho foi feita em função da padronização das Np e da facilidade de aquisição do produto de uma empresa com representação mundial.

2.1 Caracterização das AgNp

2.1.1 Espalhamento de luz dinâmico

O tamanho das AgNp foi determinado em amostras puras e misturadas com o caldo MH. Para as análises das amostras puras, pesou-se 1 mg de AgNp com ou sem PVP em balança eletrônica Shimadzu AUY 220 (Maryland 21046, U.S.A.) e suspendeu-se em 10 mL de água ultrapura por osmose reversa, em um tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada em Vortex por um min. e colocada em equipamento de ultrassom Sonifier Modelo SFX 20:0.55 na potência de 400 W (Danbury, USA) e um ciclo de 80% por 10 min, em banho em temperatura

ambiente. Pipetou-se 1 mL da suspensão e fez-se uma avaliação em equipamento de DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Worcestershire, United Kingdom). Para as análises das partículas em caldo MH utilizou-se a metodologia descrita por De Loid et al. (2017). Para tal, pesaram-se 90 mg de AgNP sem PVP e dissolveu-se em 5 mL de caldo MH, em um tubo Falcon de 15 mL, para se obter uma concentração de 18 mg/mL. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada da mesma maneira que a amostra pura. Pipetou-se 1 mL da suspensão e esta foi imediatamente colocada no equipamento DLS para a leitura do tamanho das partículas e do potencial zeta. Depois da primeira leitura, a amostra foi recolocada no equipamento de ultrassom por mais cinco minutos de sonicação e nova leitura no DLS. Outra repetição de sonicação e novas leituras foram feitas, perfazendo um total de três leituras da concentração 18 mg/mL. Após 15 min, diluiu-se a suspensão acrescentando 5 mL de caldo MH, atingindo assim uma concentração de 9 mg/mL. Foram feitos mais cinco ciclos de sonicação e leitura no DLS a cada 10 min, totalizando 50 min de sonicação e cinco leituras no DLS. Novamente diluiu-se a suspensão com 10 mL de caldo MH, obtendo uma concentração de 4,5 mg/mL. Foram realizados mais seis ciclos de 10 min de sonicação (60 min sonicação) e seis leituras no DLS. Para verificação da dissociação da suspensão, avaliou-se o potencial Zeta das três suspensões (18; 9 e 4,5 mg/mL) no equipamento DLS.

Fez-se também um branco utilizando 5 mL de caldo MH em um tubo Falcon de 15 mL que foi sonicado por 10 min e em seguida. Foram realizadas três leituras no DLS.

2.1.2 Microscopia de força atômica

Uma pequena porção de AgNp com e uma sem PVP foram retiradas dos respectivos frascos, colocadas dentro de um tubo com formato cilíndrico e fundo cônico de 1,5 mL, com tampa acoplada junto a uma mistura de álcool isopropílico e Água Milli Q em uma proporção 1:1, homogeneizadas e sonicadas em equipamento de ultrassom Sonifier Modelo SFX 20:0.55 (Danbury, USA) na potência de 400 W e um ciclo de 80% por 10 minutos em banho em temperatura ambiente. Após a sonicação, uma gota de cada suspensão de AgNp foi colocada em uma placa de vidro revestida de mica e desidratada sob atmosfera de nitrogênio. As imagens foram obtidas via modo intermitente em aparelho *Nanosurf easy Scan 2* (Nanosurf Instruments, Nanosurf AG, Switzerland), em ar. As amplitudes de oscilação livres do cantilever eram tipicamente 50 mV e o tamanho de varredura da sonda do microscópio era de 5 x 5 µm. A resolução do AFM (Atomic Force Microscopy) era de 512 x 512 pixels. O comprimento e o raio da ponta eram de 225 µm e < 10 nm, respectivamente.

2.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por MEV foi realizada na Embrapa Instrumentação em São Carlos – SP, de acordo com metodologia de Castro (2001).

2.2 Preparo dos meios de cultura e demais soluções:

O preparo do Caldo Mueller Hinton Broth (Becton Dickinson – Sparks, MD 21152 USA), Difco Mueller Hinton Ágar (Becton Dickinson - Sparks, MD 21152 USA) e do Ágar *Brain Heart Infusion* (Merck KGA – 64271- Darmstadt, Germany) foi feito de acordo com a recomendação do fabricante.

Solução McFarland:

Misturaram-se 99,5 mL de H₂SO₄ (0,36 N) e 0,5 mL de BaCl₂ (0,048 M). Após a mistura, a solução foi analisada em espectrofotômetro UV_{vis} (CECIL CE 1010) em comprimento de onda de 625 nm (leitura entre 0,08 e 0,1). Para que a leitura ficasse dentro do recomendado (0,096), foi necessário adicionar 25 mL de água deionizada por osmose reversa.

Ágar sangue:

Adicionaram-se 40 g de pó TSA (Tryptic Soy Agar - Merck KGA – 64271- Darmstadt, Germany) em 1 L de água deionizada por osmose reversa, seguindo a recomendação do fabricante. Em seguida, a solução de Ágar TSA foi autoclavada à 121 °C por 15 min. Depois ela foi colocada em uma cuba no banho maria a 50°C.

Anteriormente, haviam sido coletados no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite de Coronel Pacheco – MG, 500 mL de sangue de um carneiro. O sangue foi processado, desfibrinado e resfriado. No momento do uso, o ágar TSA foi retirado do banho maria e feita a adição de 50 mL do sangue de carneiro em 1 L de ágar TSA. Após homogeneização, o Ágar foi vertido em placas.

2.3 Microrganismos utilizados e preparo do inóculo

As amostras de *S. aureus* utilizadas nesse estudo foram obtidas da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG. Elas foram isoladas de amostras de leite provenientes de rebanhos leiteiros de Minas Gerais, no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG) e com caracterização genotípica e avaliação do perfil de resistência contra os principais antimicrobianos utilizados na clínica veterinária (ampicilina, penicilina, tetraciclina, eritromicina, enrofloxacina e clindamicina). Os testes foram feitos com amostras consideradas de maior resistência contra os principais antimicrobianos testados nesse mesmo Laboratório (amostras nº 212; 215; 617; 618; 619; 656; 696), com amostras sensíveis (amostras nº 267; 268; 268; 290), intermediárias (amostras nº 151; 213; 216; 223; 228) e uma amostra padrão, sensível, para controle do processo (ATCC 29 213). Também foram usadas algumas amostras que ainda não tiveram sua resistência avaliada (2243, 2309, 4099, 4498, 5329, 5700, Cap.5 e Cap.8).

A preparação do inóculo foi feita em duas etapas. Primeiramente, após a retirada do freezer, as amostras foram semeadas em placas de ágar sangue e mantidas a 35°C e 5% de CO₂ por 24 h. Depois, foram colocadas em placas de ágar BHI. As placas contendo BHI foram então incubadas em estufa a 35°C e 5% de CO₂ por 24 h para obtenção de um pré-inóculo. Após 24 h e com auxílio de uma alça, cinco colônias isoladas de cada placa foram semeadas em tubos contendo 2 mL de caldo BHI, que foram imediatamente incubados a 35°C e 5% de CO₂ por 4 h.

Na segunda etapa, os tubos contendo caldo BHI foram retirados da estufa e fez-se o ajuste da turvação de acordo com a escala Mc Farland 0,5. Prepararam-se tubos de 15 mL com 8,8 mL de caldo MH e tubos de 7 mL com 2 mL de caldo MH.

Primeiramente, fez-se a diluição de uma parte da solução bacteriana (inóculo) que estava nos tubos com BHI em cinco partes de caldo MH. A cultura obtida ficou na concentração de 5 x 10⁶ UFC/mL. Em seguida fez-se nova diluição para a concentração final de 5 x 10⁵ UFC/mL.

2.4 MIC em caldo Mueller Hinton

Os testes de MIC foram realizados em caldo MH em três etapas. Na primeira, foram utilizadas cinco amostras de *S. aureus* consideradas de maior resistência (amostras nº 617; 618; 619; 656; 696) e uma amostra padrão (ATCC 29 213). Na segunda etapa, utilizaram-se mais duas amostras resistentes (amostras nº 212; 215) e também três consideradas sensíveis (amostras nº 267; 268; 290), duas intermediárias (amostras nº 213; 223) e uma amostra padrão (ATCC 29 213). Na terceira etapa, utilizaram-se dez amostras de bactérias, três resistentes (amostras nº 215; 212; 617), três intermediárias (amostras nº 216; 151; 228), três sensíveis (amostras nº 268; 267; 290) e uma padrão (ATCC 29 213).

Os inóculos contendo as amostras selecionadas foram semeados, com auxílio de uma alça, em placas com Ágar BHI e colocadas em estufa a 35° C e 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, as placas foram retiradas da estufa e as amostras que cresceram foram transferidas para uma nova placa com ágar sangue e colocadas na estufa a 35°C e 5% de CO₂ por mais 24 h. As amostras foram retiradas da estufa após 24 h e armazenadas em geladeira a 8°C. No momento da realização dos testes, as amostras foram retiradas da refrigeração e algumas colônias foram semeadas, com auxílio de uma alça, e as placas novamente incubadas em estufa a 35°C e 5% de CO₂ por mais 24 h.

2.4.1 Preparo da solução de AgNp

Para as séries de MIC realizadas com AgNp sem PVP, pesaram-se 3,85 mg da Np e dissolveram-se em 15 mL de caldo MH (3.850 ppm /15 mL), resultando em uma concentração final de 256 µg/mL (solução mãe 256 µg/mL). A suspensão foi colocada em tubo cônico de 50 mL e sonicada em equipamento de ultrassom Hielscher UP 200 S por um período de uma hora, com um ciclo de 0,7 e amplitude de 75%, em banho de gelo.

Para a realização de MIC de AgNp com PVP, pesaram-se 1.000 mg da Np e dissolveu-se em 50 mL de Caldo MH, resultando em uma concentração final de 20 mg/mL (solução mãe 20 mg/mL). A suspensão foi então sonicada, seguindo os mesmos procedimentos utilizados anteriormente. As suspensões de AgNp não ficavam armazenadas. Em cada ensaio era preparada uma nova suspensão.

2.4.2 Preparo da solução

Para preparo das soluções (caldo MH + AgNp + Inóculo) usadas na primeira e segunda etapas foram preparados dez tubos para cada uma das amostras testadas e dez tubos para a amostras padrão (ATCC 29213). Colocou-se no primeiro tubo 1 mL da suspensão de AgNp solução mãe 256 µg/mL. Em seguida foi acrescido, do tubo dois até o tubo 10; 1 mL de caldo MH. Posteriormente, acrescentou-se 1 mL de inóculo em todos os tubos. No final, foram feitas as diluições seriadas acrescentando 1 mL de cada tubo no tubo posterior para se obter as concentrações finais de: 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1 e 0,5 µg/mL. Além dos tubos com as suspensões de bactérias, foi feito um tubo chamado de controle positivo (CP) contendo apenas caldo MH e o inóculo bacteriano.

Na terceira etapa, foi usada a solução mãe 20 mg/mL e foram preparados cinco tubos para cada uma das amostras testadas e cinco para a amostra padrão (ATCC 29213), sendo um dos tubos

para o CP. O preparo dos tubos foi feito da mesma maneira que nas etapas anteriores, obtendo-se as seguintes concentrações finais: 1,5; 2,0; 2,5 e 10 mg/mL.

Em todas as etapas, após o preparo, os tubos eram colocados em estufa a uma temperatura de 35°C e 5% de CO₂ por 24 h.

2.4.3 Leitura

Após 24 h, os tubos foram retirados da estufa e realizou-se a leitura visual de acordo com a escala McFarland 0,5. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 200 µL de cada tubo e dispersou-se nos poços de uma placa de cultivo de 96 poços. A leitura da placa foi realizada em Espectrofotômetro EON ELX 800 (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT – USA) com leitura em comprimento de onda de 625 nm. Os testes da primeira etapa do MIC foram feitos em triplicata, na segunda etapa em duplicata e na terceira não foi possível fazer a leitura no EON, pois o meio estava muito turvo. Em cada etapa foram feitas dez repetições de cada concentração.

Para confirmar se houve crescimento, fez-se também um cultivo em placas com ágar BHI dos conteúdos de cada tubo. As placas foram colocadas em estufa a uma temperatura de 35°C e 5% de CO₂ por um período de 24 h e, então, avaliadas visualmente.

2.5 MIC em Ágar Gel

2.5.1 Testes preliminares para verificar a diluição das AgNp

Para verificar a melhor maneira de homogeneizar as AgNp em ágar gel, pesaram-se 24 mg de AgNp sem PVP e diluiu-se em 6 mL de Ágar BHI, em um tubo Falcon de 15 mL. O tubo com a suspensão foi acoplado em equipamento de ultrassom Hielscher UP 200 (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha) por um período de cinco minutos, com um ciclo de 0,7 e amplitude de 75%. Após a sonicação, o tubo com a suspensão foi imediatamente imerso em um Béquer com gelo e foi verificado o tempo de solidificação do ágar com as AgNp e a eventual presença de AgNp sedimentadas.

Em uma segunda fase de testes, pesaram-se quatro amostras de AgNp sem PVP, sendo duas amostras de 250 mg e outras duas de 500 mg. As AgNp pesadas em tubos Falcon de 50 mL e os demais equipamentos necessários para o preparo do meio foram desinfetados com álcool 70% e colocados na câmara de exaustão com a luz UV ligada por 15 min antes de iniciar os procedimentos. Paralelamente, prepararam-se duas garrafas de 100 mL, sendo uma com ágar MH e outra com ágar BHI, de acordo com metodologia descrita pelo fabricante. Após o término da esterilização (autoclave a 121°C por 15 min) dos dois meios de cultura, verteu-se uma alíquota de 50 mL em cada tubo com AgNp, a fim de se obter soluções de 5 mg/mL e 10 mg/mL para cada um dos meios de cultura. Os tubos foram encaminhados para a sonicação em equipamento de ultrassom Hielscher UP 200 S (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha) por um período de cinco minutos, com um ciclo de 0,7 e amplitude de 75%. Após a sonicação, as suspensões de ágar com AgNp foram vertidas em placas de Petri sob uma bandeja com gelo para imediato resfriamento e solidificação. Para o ágar BHI foram feitas quatro placas com 5 mg/mL de AgNp e quatro com 10 mg/mL. O mesmo foi feito para o ágar MH. Após 24 h em estufa a 31° C para teste de esterilidade, as 16 placas com meio de cultura e AgNp e quatro placas para controle positivo (CP = placas apenas com ágar MH e BHI, sem AgNp) foram levadas para câmara de exaustão e divididas em oito quadrantes cada uma. Para a inoculação nas placas

foram empregadas oito amostras de *S. aureus* de perfil de resistência ainda não identificado, n° 5700; 2243; 5329; 4099; Cap 8; 2309; Cap 5; 4498. Após cultivo em placas de ágar BHI, fez-se uma suspensão com solução salina a 0,85% em tubos, de acordo com a escala McFarland 0,5 (na concentração de 10^5) e com o auxílio de uma alça descartável, semeou-se 1 μ L da solução com o inóculo de cada bactéria em um quadrante. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 35°C e 5% de CO₂ por 24 h.

2.5.2 MIC em Ágar gel de BHI

Os testes de MIC em ágar BHI foram realizados em três séries, com todas as amostras provenientes da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG. Na primeira e na segunda etapas foram utilizadas 15 amostras de *S. aureus*, sendo cinco resistentes (amostras n° 215; 617; 618; 619 e 656), quatro sensíveis (amostras n° 212; 267; 268 e 290), cinco intermediárias (amostras n° 151; 213; 216; 223 e 228) e uma padrão (ATCC 29213). Um terceiro ensaio foi realizado utilizando as mesmas 15 amostras de *S. aureus* citadas anteriormente e mais oito amostras com sensibilidade desconhecida (2243, 2309, 4099, 4498, 5329, 5700, Cap.5 e Cap.8), totalizando 23 amostras. As placas foram confeccionadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

No primeiro ensaio, utilizou-se a AgNp sem PVP, nas seguintes concentrações: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mg/mL (em duplicata). Na realização do ensaio com caldo MH, verificou-se que a concentração para o MIC deveria ser mais alta do que a utilizada inicialmente, por isso as concentrações são mais elevadas que as empregadas nos dois primeiros ensaios com caldo MH. Nesse caso, não houve necessidade de preparar uma solução mãe e as AgNp foram pesadas diretamente nos tubos Falcon onde seriam acrescentados os inóculos. No segundo ensaio, utilizou-se AgNp com PVP, nas seguintes concentrações: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 mg/mL (em duplicata). Durante o segundo ensaio, algumas amostras apresentaram resultados inconclusivos na concentração de 2,5 mg/mL. Por isso, realizou-se um terceiro ensaio utilizando-se AgNp com PVP, nas seguintes concentrações: 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mg/mL. As placas para realização do controle positivo foram feitas da mesma maneira do que no caldo MH.

As bactérias, após serem cultivadas em estufa a 35°C e 5% de CO₂ por 24 h, foram transferidas para um tubo com 2 mL de solução salina a 0,85% na concentração de 10^5 UFC/mL, de acordo com a Escala McFarland 0,5. A leitura e a confirmação do crescimento foram realizadas da mesma maneira que o descrito para o teste com caldo MH, com exceção da leitura no EON, que não foi feita nos testes com ágar.

2.5.3 MIC em ágar gel de MH

No intuito de avaliar a possibilidade do uso do ágar MH para realização de MIC de AgNp com PVP, foi realizado um ensaio nas mesmas condições que o empregado no terceiro ensaio com ágar gel de BHI. Foram utilizadas as mesmas 23 amostras de *S. aureus* e empregou-se a mesma metodologia citada anteriormente para o preparo de placa e o semeio. As únicas diferenças referem-se ao meio de cultura (ágar MH) e as concentrações utilizadas (1,0; 3,0 e 7,0 mg/mL de AgNp).

2.6 Testes de toxicidade

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das AgNp em células do úbere bovino, cultivaram-se células MAC-T bovinas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

A cultura de células foi feita seguindo os seguintes procedimentos:

Descongelou-se 1,5 mL das células do criotubo em temperatura ambiente e o conteúdo foi dispensado em um tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, centrifugou-se a suspensão celular a 1.448 G por cinco min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi suspenso em 1 mL de meio de cultura (DMEM) acrescido de 4 mM de L-glutamina; 1 mM de piruvato de sódio; 5 ug/mL de insulina; 1 ug/mL de hidrocortisona; 10% de soro fetal bovino; 100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomina. Após o acréscimo dos adjuvantes, a suspensão celular foi colocada em uma garrafa de cultivo de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura e incubada a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

Para o tratamento das células:

Retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas duas vezes, com 2 ml de 1X PBS (pH 7,2). O excesso foi retirado e adicionaram-se às células, 2 ml de uma solução contendo 0,25% de tripsina + 0,02% de EDTA. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 10 min. Após a observação se as células se desprenderam, a garrafa foi batida sutilmente para que as células se soltassem. A tripsina foi inativada adicionando-se 2 mL de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino e a suspensão foi retirada com o auxílio de uma pipeta e transferida para um tubo Falcon de 15 ml. A suspensão foi centrifugada por cinco min, a 1.448 G em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado e o sedimento, suspenso em 1 mL de meio de cultura.

Contagem das células:

Dispensaram-se 10 ul da suspensão celular na câmara de *Neubauer*, fez-se a contagem das células presentes nos quatro grandes quadrantes externos. Em seguida, calculou-se a média da contagem e multiplicou-se por 10.000 (fator de correção), obtendo-se, assim, o número de células contidas em 1 mL. Fez-se uma regra de três para o número de células desejado por poço para saber quantos microlitros da suspensão eram necessários serem adicionados por poços. Após a suspensão de 1 mL de sedimento, o cálculo resultou em em 0,5 x 10⁶ células por poço.

Suspensão de AgNp:

Pesaram-se 6 mg de AgNp e suspenderam-se em 6 mL de DMEM. Em seguida, sonicou-se em ultrassom Hielscher UP 200 S (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha) por um período de cinco minutos, com um ciclo de 0,7 e amplitude de 75%, formando uma suspensão de 1000 ug AgNp/mL.

Plaqueamento:

Distribuíram-se 600 uL de meio de cultura em cada poço de uma placa de cultivo de 24 poços. Em seguida, as células foram semeadas na densidade de 0,2x10⁵ e incubadas a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂, por 24h. Após a aderência das células, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se novo meio de cultura às células, contendo a suspensão de AgNp nas concentrações de 250 ug/mL, 500 ug/mL e 750 ug/mL. As células expostas as AgNp ficaram nas seguintes concentrações (**Tabela 7**):

Tabela 7 - Volume de cada um dos componentes da solução de incubação das Células MAC-T.

Componentes	Volume (mL)		
	250 µg/mL	500 µg/mL	750 µg/mL
Total	360	360	360
AgNp	900	1800	2700
Soro Fetal Bovino	360	360	360
L. Glutamina	72	72	72
Antimicrobiano	36	36	36
Piruvato	36	36	36
Hidrocortizona	36	36	36
Insulina	36	36	36
DMEM	2124	1224	324

O controle negativo foi o meio de cultura suplementado. Após a adição das soluções, as células foram incubadas a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂, por 24h.

As células foram retiradas da estufa após 24 h de exposição. Retirou-se o meio de cultura (DMEM) e adicionaram-se 200 µl de uma solução de azul de Tripán a 0,4%. Incubou-se por 10 min a 37°C e 5% de CO₂ e em seguida, foi feita a leitura no Microscópio ótico Zeiss Primo Vert na configuração de 200 x (Carl Zeiss, Gottingen, Germany). Verificou-se na leitura que havia algumas partículas sólidas de Azul de Tripán no fundo da placa. Assim, adicionaram-se 500 mvl de uma solução de PBS para limpeza e nova incubação por mais 10 min nas mesmas condições citadas anteriormente. Foi feita nova leitura e as placas foram fotografadas por câmera Axio CAM ERc 5s, e ajustadas pelo programa Axion Vision LE.

3 Resultados e Discussão:

3.1 Caracterização das AgNp

A composição, tamanho, forma e área de superfície das Np são variáveis importantes que determinam o comportamento dessas partículas e suas interações com os sistemas biológicos. Suas propriedades também são influenciadas pelas interações com estabilizantes e o meio em que se encontram e pelos métodos empregados na preparação da amostra (El-Kheshen et al, 2012; Paredes et al., 2014). Para verificar o efeito da sonicação na distribuição do tamanho de partículas, foram feitos vários ciclos de sonicação e leitura do caldo MH com AgNp. O objetivo desse estudo foi de fazer uma análise qualitativa das características das AgNp usadas. Os resultados obtidos nas suspensões de AgNp na concentração de 9 mg/mL foram apresentados na **Figura 5** e o mesmo tipo de distribuição de tamanho de partículas foi obtido nas demais concentrações (dados não apresentados). Observou-se que o tempo de sonicação não alterou de modo significativo a distribuição do tamanho das AgNp. A figura 6 indica que também não houve grande diferença na distribuição do tamanho de partículas entre os caldos com concentrações diferentes (2,56; 4,5; 9,0 e 18,0 mg/mL).

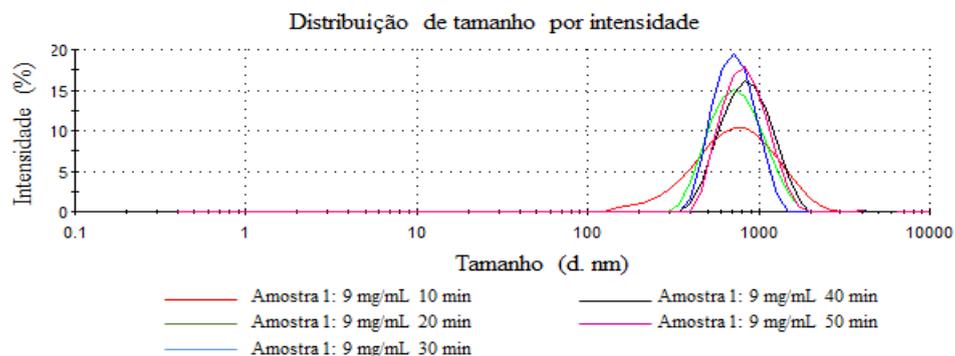


Figura 5 - Distribuição de tamanho das AgNp obtidas por espalhamento de luz dinâmico das AgNp em caldo Mueller Hinton com a concentração de 9 mg/mL, após diferentes tempos de sonicação.

O valor médio de tamanho, considerando todas as concentrações, foi de 946,99 nm. Nas diferentes suspensões de AgNp, o valor médio do tamanho das partículas foi de 1.164,67 nm; 906,52 nm e 900,11 nm em 4,5; 9,0 e 18,0 mg/mL, respectivamente (**Figura 6**). Paredes et al. (2014) observaram sedimentação em suspensões de AgNp preparadas sob forte agitação (800 rpm por 1h) e atribuíram isso à maior coalescência que provocou rápida agregação das partículas e induziu a formação de grandes clusteres. Nesse experimento, os resultados obtidos na leitura da suspensão de 2,56 µg/mL demonstram que, apesar do grande tamanho das AgNp, o uso do ultrassom com potência baixa (Hielscher UP 200 S por um período de uma hora, com um ciclo de 0,7 e amplitude de 75%) não altera a estabilidade da suspensão.

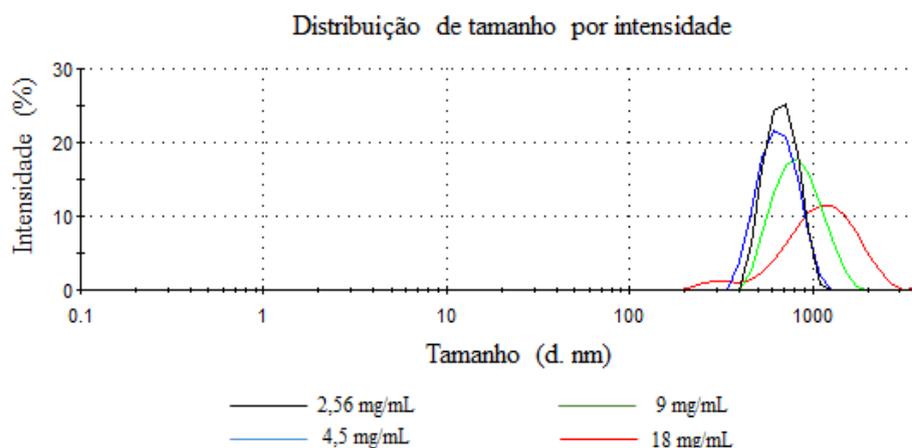


Figura 6 - Distribuição de tamanho das AgNp obtida por espalhamento de luz dinâmico das AgNp em caldo Mueller Hinton com diferentes concentrações.

O tamanho médio encontrado nas suspensões de AgNp em caldo MH mostrou-se muito superior ao fornecido pela empresa Sigma Aldrich (aproximadamente 100 nm) e também superior ao observado nas amostras de AgNp em água deionizada por osmose reversa (**Figura 7**). Isso pode ter resultado na agregação das Np no meio biológico (caldo MH), concordando com o que foi observado nas imagens obtidas de AFM (ver a seguir) e indicando que o processo de sonicação da suspensão não foi suficiente para promover a desagregação. A adsorção de biomoléculas à superfície das Np é um processo conhecido e tem grande influência na ação dos fármacos em

meio biológico (Obst et al., 2017). *In vivo*, a adsorção de proteínas às Np, fenômeno chamado de proteína-corona, é um processo dinâmico que afeta o desempenho das Np e que deve ser considerado na formulação de medicamentos (Hadjidemetriou e Kostarelos, 2017).

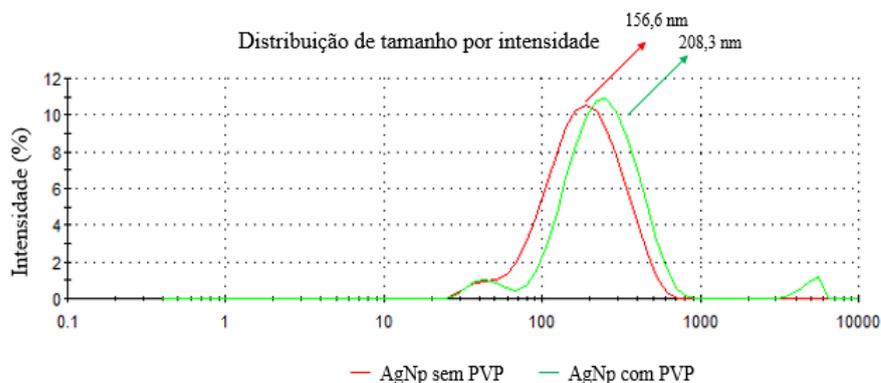


Figura 7 - Distribuição de tamanho das AgNp obtida por espalhamento de luz dinâmico das AgNp sem ou com PVP em uma mistura de água deionizada por osmose reversa e álcool isopropílico.

A análise do tamanho de partículas no caldo MH puro também foi realizada. Para tal amostra não foram encontradas partículas de tamanho inferior a 1.000 nm de diâmetro médio (dados não apresentados), podendo-se inferir que estas partículas não interferiram na determinação do tamanho das AgNp.

O uso de polímeros na síntese de Np aumenta a estabilidade das AgNp por influenciar o tamanho e agregação das partículas (Paredes et al., 2014). Uma vez que o trabalho foi realizado com dois lotes de AgNp com e sem a presença do dispersante PVP, amostras de mesma concentração e tempo de sonicação foram preparadas para cada um dos lotes. Os resultados mostrados na Figura 7 indicam que o tamanho médio das partículas era inferior nas amostras sem PVP, podendo ser o resultado de uma maior aglomeração das partículas em amostras contendo PVP, conforme observado nas imagens de AFM (ver a seguir). Na leitura do potencial Zeta, as AgNp sem PVP, apresentaram carga negativa (-16 mV), indicando a baixa estabilidade das suspensões (**Figura 8**), o que era esperado, pois o PVP é utilizado para estabilizar as partículas (El-Khesehn et al., 2012). Não só a presença de estabilizantes, mas também o tipo de estabilizante usado na confecção das Np pode influenciar na sua carga superficial e, conseqüentemente, nas suas propriedades antimicrobianas (El-Khesehn et al., 2012; Cavassin et al, 2015). O uso de quitosana, por exemplo, origina AgNp com carga positiva (+41,1 mV), enquanto o uso de citrato torna as partículas negativas (-48,4 mV) (Cavassin et al, 2015). Quando foi usado o polivinil álcool, Cavassin et al. (2015) obtiveram-se partículas com carga semelhante (-17,0 mV) à observada nesse experimento.

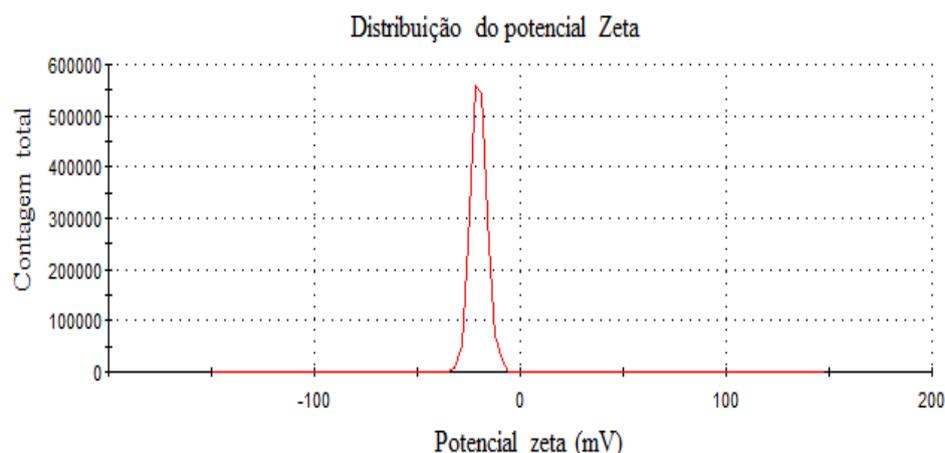


Figura 8 - Curva do potencial Zeta para suspensões de AgNp sem PVP.

Analisando a imagem obtida para as AgNp sem PVP por AFM (**Figura 9**), pode-se observar que as mesmas se encontram monodispersas e esféricas de forma semelhante às obtidas para o experimento de determinação de tamanho por DLS, quando as suspensões foram preparadas em água. Este resultado corrobora com a hipótese de que a suspensão das AgNp agrega menos em uma mistura de álcool isopropílico e água quando comparado aos meios biológicos utilizados nos experimentos de determinação da MIC. Já as imagens das suspensões de partículas de AgNp com PVP mostraram a presença de grandes agregados de prata recobertos por um filme de PVP (**Figura 10**). Esses resultados são semelhantes aos de El-Khesehn et al. (2012) que observaram por microscopia eletrônica de transição a formação de aglomerados em amostras de AgNp com PVP.

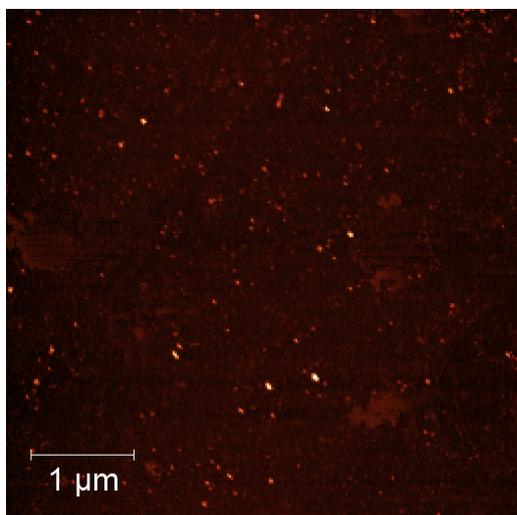


Figura 9 - Imagem de microscopia de força atômica de uma suspensão de AgNp sem PVP, em uma mistura de água e álcool isopropílico.

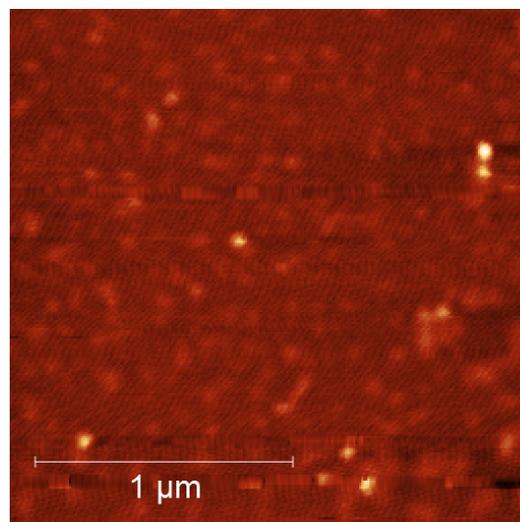


Figura 10 - Imagem de microscopia de força atômica de uma suspensão de AgNp com PVP, em uma mistura de água e álcool isopropílico.

A avaliação das imagens de AgNp sem PVP obtidas por microscopia eletrônica de varredura também demonstra uma aglomeração das Np formando grandes clusters (**Figura 11**).

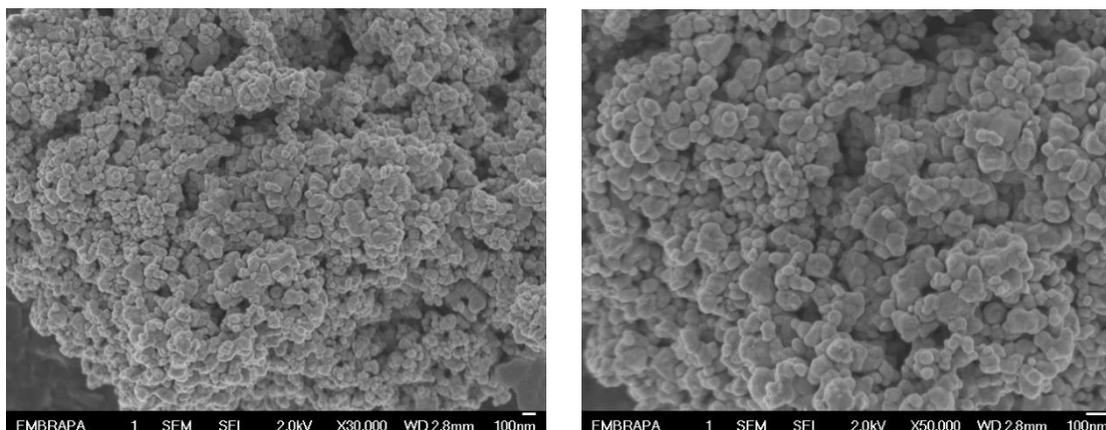


Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura de AgNp sem PVP.

3.2 MIC em caldo MH

As AgNp possuem conhecida atividade bacteriostática e bactericida contra uma grande variedade de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas (El-Khesehn et al., 2012). As possibilidades de uso dessa partícula em produtos de uso cotidiano e medicamentos são inúmeras. Porém, ainda subsistem muitas dúvidas em relação ao seu comportamento em meio biológico e sua atividade antimicrobiana (Chen et al., 2008). Nesse experimento, foi avaliada a MIC de AgNp em diferentes amostras de *S. aureus* isoladas de rebanhos leiteiros, usando três meios de cultura: caldo MH, ágar BHI e ágar MH. Na primeira etapa de testes com caldo MH, observou-se crescimento em todos os tubos com a suspensão de bactérias e AgNp sem PVP, em concentrações variando de 0,5 a 128 µg/mL. A leitura visual foi feita de acordo com a escala McFarland 0,5 e confirmada no espectrofotômetro. O cultivo em placas com ágar BHI (**Tabela 8**) também mostrou o crescimento de todas as amostras testadas.

Tabela 8 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus*, isolados de rebanhos leiteiros de MG, em caldo MH com AgNp de 100 nm sem PVP, em concentrações variando de 0,5 a 128 µg/mL na primeira etapa de testes com dez repetições.

Amostra de <i>S. aureus</i>	Concentração das nanopartículas de prata (µg/mL)									CP*
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	
617	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
618	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
619	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
656	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
696	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Controle positivo (placa sem AgNp)

Todas as amostras de bactérias usadas na primeira série de testes eram resistentes aos principais antimicrobianos, com exceção da ATCC. Por isso, o teste em caldo MH foi repetido, incluindo-se também bactérias de baixa e média resistência. Os resultados obtidos foram os mesmos da

primeira etapa, com resultado positivo para todas as culturas em todas as concentrações na leitura visual e confirmação por espectrofotometria e pelo cultivo em placas de ágar BHI (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus*, isolados de rebanhos leiteiros de MG, em caldo MH com AgNp de 100 nm sem PVP em concentrações variando de 0,5 a 128 µg/mL na segunda etapa de teste com dez repetições.

Amostra de <i>S. aureus</i>	Concentração das nanopartículas de prata (µg/mL)									CP*
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	
212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
213	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
215	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
223	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
267	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
268	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
290	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Controle positivo (placa sem AgNp)

Os resultados obtidos nas duas primeiras séries de testes mostraram que uma concentração de AgNp de até 128 µg/mL não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Por isso, realizou-se uma terceira série de testes usando suspensões de AgNp mais concentradas (de 1,5 até 10 mg/mL). Infelizmente, a alta concentração de AgNp utilizada deixou o meio muito escuro, dificultando a visualização e gerando dúvidas sobre a turvação ou não do meio. Desta forma, não foi possível fazer a leitura visual de acordo com a escala McFarland e nem a leitura no espectrofotômetro EON. A confirmação do resultado positivo foi realizada em placas de ágar BHI onde observou-se crescimento em todas as concentrações de AgNp nas dez amostras de *S. aureus* utilizadas (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus*, isolados de rebanhos leiteiros de MG, em caldo MH com AgNP de 100 nm com PVP em concentrações variando de 1,5 a 10 mg/mL na terceira etapa de teste com dez repetições.

Amostra de <i>S. aureus</i>	Concentração das nanopartículas de prata (mg/mL)				CP*
	1,5	2,0	2,5	10	
151	+	+	+	+	+
212	+	+	+	+	+
215	+	+	+	+	+
216	+	+	+	+	+
228	+	+	+	+	+
267	+	+	+	+	+
268	+	+	+	+	+
290	+	+	+	+	+
617	+	+	+	+	+
ATCC	+	+	+	+	+

*Controle positivo (placa sem AgNP)

Os resultados encontrados na técnica de diluição em caldo MH mostraram que as AgNp nas concentrações utilizadas (até 128 µg/mL para AgNp sem PVP e até 10 mg/mL para AgNp com PVP) não foram eficientes para inibir o crescimento de *S. aureus*. Esse resultado contradiz o que foi observado por outros autores que avaliaram a atividade antimicrobiana de AgNp contra *S. aureus* isolados de casos de mastite e obtiveram MICs entre 1,25 e 10 µg/mL (Dehkordi et al., 2011; Yuan et al., 2017). A ação da AgNp é tempo e dose-dependente (Paredes et al., 2014; Yuan et al., 2017), variando com a concentração bacteriana inicial (Paredes et al., 2014). Outros parâmetros, como o tamanho das partículas e o meio de cultura utilizado para a determinação da MIC também influenciam a atividade antimicrobiana. Neste estudo, as AgNp tinham diâmetro superior à 100 nm, bem maiores do que as utilizadas nos trabalhos de Dehkordi et al., 2011 (10 nm) e Yuan et al., 2017 (20 nm). Como a atividade antimicrobiana das AgNp aumenta quando a relação área de superfície/volume é maior, partículas menores são mais eficientes, pois há melhor contato com as células microbianas (El-Khesehn et al., 2012; Martínez-Castañón et al., 2008). Martínez-Castañón et al. (2008) avaliaram o efeito antimicrobiano de AgNp com PVP de três tamanhos (7 nm, 29 nm e 89 nm) e os valores de MIC para *S. aureus* foram de 7,5; 16,67 e 33,71 µg/mL, respectivamente e para *E. coli* 6,25; 13,02 e 11,79 µg/mL, respectivamente.

Cavassin et al. (2015) avaliaram cinco tipos distintos de AgNp para controle de *S. aureus*. O MIC variou de 13,5 a ≥ 54 µg/mL, dependendo do tipo de Np e do estabilizante utilizado. Comparando o uso de diferentes agentes redutores na confecção de AgNp (glicose, NaBH₄, citrato de sódio e ácido ascórbico), El-Khesehn et al. (2012) concluíram que o uso de glicose encapsula as Np, inativando-as. Dentro desse contexto, pode-se dizer que os fatores que afetam a atividade microbiana das Np são inúmeros e é difícil estabelecer uma única explicação para a ausência de atividade antimicrobiana nesse experimento. Os resultados obtidos sugerem que houve baixa solubilidade das AgNp no caldo MH. Durante o processo de sonicação da suspensão, observou-

se que alguns minutos após a homogeneização, já havia precipitação de AgNp no tubo com a solução mãe e nos tubos inoculados com concentrações mais altas (**Figura 12** e **Figura 13**).

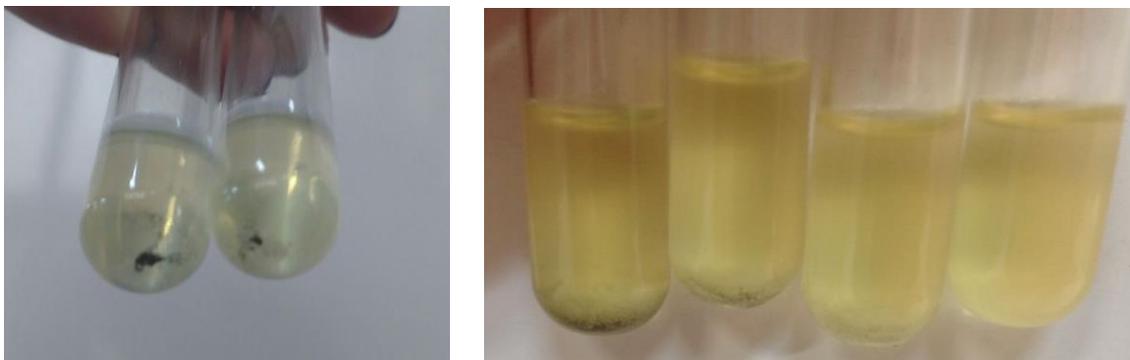


Figura 12 - Precipitação das AgNp sem PVP em caldo MH.

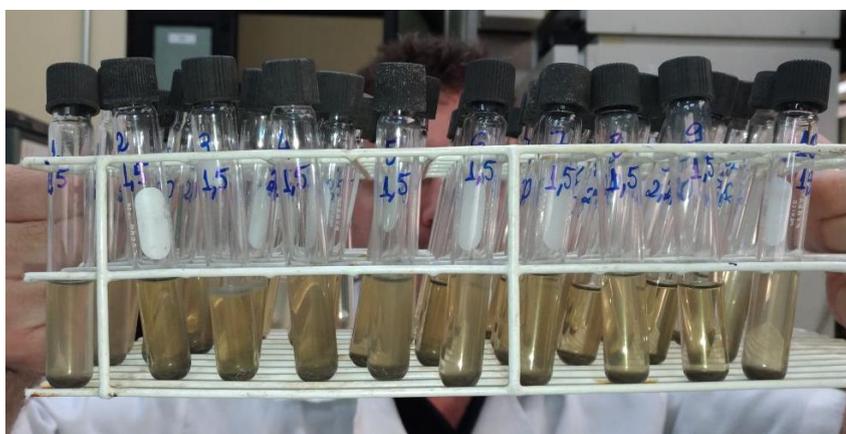


Figura 13 - Precipitação das AgNP com PVP em caldo MH.

3.3 MIC em ágar gel

A atividade inibitória das AgNp foi testada em ágar, usando primeiramente BHI e depois MH. Para evitar os problemas de precipitação observados anteriormente, foram realizados alguns testes preliminares para se verificar qual seria a melhor maneira de diluir as partículas. Observou-se que, com o imediato resfriamento após a sonificação, a solidificação foi muito rápida, não havendo tempo para a decantação das AgNp. A amostra ficou homogênea (**Figura 14**), sugerindo que essa seria uma boa opção para estabilizar a suspensão de AgNp.



Figura 14 - Tubo Falcon de 15 mL com AgNp em ágar BHI.

Para comprovar a eficiência do método de sonicação seguido de resfriamento imediato, realizou-se uma segunda fase de testes, usando suspensões de AgNp em duas concentrações (5 e 10 mg/mL), os dois meios de cultura que seriam utilizados na determinação da MIC (ágar BHI e MH) e culturas de *S. aureus* isoladas de rebanhos leiteiros. Os resultados da leitura visual das amostras em solução salina de acordo com a escala McFarland foram confirmados com o cultivo em ágar (**Tabela 11**). Verificou-se que, no teste feito em ágar BHI, houve crescimento das amostras de *S. aureus* usadas no ensaio na presença de AgNp na concentração de 5 mg/mL e total inibição quando usada a suspensão de 10 mg/mL. Quando a inoculação foi feita em ágar MH, houve crescimento em ambas concentrações em todas as amostras de *S. aureus*. Pode-se dizer que a metodologia empregada para preparar os meios sólidos contendo AgNp parece adequada para avaliação da atividade antimicrobiana e por isso foi utilizada na determinação da MIC. Contudo, os resultados obtidos nos testes preliminares indicam que a atividade inibitória da AgNp pode variar de acordo com o meio de cultura empregado na análise, justificando a comparação entre diferentes meios.

Tabela 11 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus*, isolados de rebanhos leiteiros de MG, em ágar BHI e em ágar MH contendo AgNp de 100 nm sem PVP nas concentrações de 5 e 10 mg/mL nos testes preliminares.

Amostra de <i>S. aureus</i>	Ágar BHI						Ágar MH						
	AgNp		AgNp		CP		AgNp		AgNp		CP		
	5 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	
5700	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2243	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5329	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4099	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cap 8	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2309	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cap 5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4498	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Controle positivo (placa sem AgNP)

3.3.1 MIC em ágar gel de BHI

A **Tabela 12** mostra os resultados obtidos na primeira fase de testes da MIC em ágar BHI, quando foi usada AgNp sem PVP em concentrações variando de 5 a 15 mg/mL. Observou-se inibição do crescimento bacteriano a partir de 5,5 mg/mL e apenas uma amostra (n° 656, classificada como resistente aos principais antimicrobianos testados) apresentou crescimento em uma das placas na concentração 6,0 mg/mL. Na segunda etapa, os testes foram repetidos usando suspensões menos concentradas de AgNp (nesse caso com PVP). Observou-se que a inibição ocorreu em concentrações mais baixas; na concentração de 3,0 mg/mL todas as amostras foram inibidas e em 2,5 mg/mL, apenas cinco amostras crescerem em uma das placas (**Tabela 13**). Esse resultado foi confirmado no terceiro ensaio, quando se obteve inibição do crescimento de todas amostras avaliadas quando foi usado AgNp com PVP na concentração de 2,5 mg/mL (**Tabela 14**). Não houve diferença entre bactérias resistentes ou sensíveis, resultado semelhante ao observado por Cavassin et al. (2015).

Tabela 12 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus*, isolados de rebanhos leiteiros de MG, em ágar BHI com AgNp de 100 nm sem PVP em concentrações variando de 5 a 15,0 mg/mL na primeira etapa de testes.

Amostra de <i>S. aureus</i>	Concentração das nanopartículas de prata (mg/mL)													CP*
	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	12,5	15,0	
212	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
213	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
215	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
216	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
223	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
228	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
267	+	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
268	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
290	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
617	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
618	+	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
619	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
151	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
656	+	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ATCC	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

*Controle positivo (placa sem AgNp)

Tabela 13 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de rebanhos leiteiros de MG em ágar BHI com AgNp de 100 nm com PVP em concentrações variando de 1,0 a 7,0 mg/mL na segunda etapa de testes.

Amostra de	Concentração das nanopartículas de prata (mg/mL)													CP*
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	
<i>S. aureus</i>														
212	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
213	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
215	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
216	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
223	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
228	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
267	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
268	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
290	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
617	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
618	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
619	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
151	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
656	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ATCC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

*Controle positivo (placa sem AgNP)

Tabela 14 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de rebanhos leiteiros de MG em ágar BHI com AgNp de 100 nm com PVP variando de 1,5 a 3,5 mg/mL na terceira etapa de testes.

Amostra de <i>S. aureus</i>	Concentração das nanopartículas de prata (mg/mL)					CP
	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	
212	+	+/-	-	-	-	+
213	+	-	-	-	-	+
215	+	-/+	-	-	-	+
216	+	+	-	-	-	+
223	+	-	-	-	-	+
228	+	-	-	-	-	+
267	+	-	-	-	-	+
268	+	-	-	-	-	+
290	+	-	-	-	-	+
617	+	-	-	-	-	+
618	+	-/+	-	-	-	+
619	+	+	-	-	-	+
151	+	-	-	-	-	+
656	+	-	-	-	-	+
2243	+	+/-	-	-	-	+
2309	-	-	-	-	-	+
4099	+	+/-	-	-	-	+
4498	+	-	-	-	-	+
5329	+	-	-	-	-	+
5700	+	-	-	-	-	+
Cap. 5	+	+	-	-	-	+
Cap. 8	+	-	-	-	-	+
ATCC	+	-	-	-	-	+

*Controle positivo (placa sem AgNP)

Os resultados para a MIC de AgNp em ágar BHI (2,5 mg/mL) foram semelhantes aos observados por Ayala-Núñez et al. (2009) em amostras de MRSA. Contudo, são superiores aos obtidos por outros autores que avaliaram AgNp de tamanhos inferiores a 50 nm (Cho et. al., 2005; Dehkordi

et al., 2011; Sadeghi et al., 2012; Paredes et al., 2014). O tamanho das AgNp é um dos fatores que explica a diferença entre esses resultados, mas a metodologia usada nos diferentes trabalhos também influencia a atividade da AgNp, dificultando a comparação entre eles. Cavassin et al. (2015) não detectaram diferenças entre o uso do caldo TBS ou caldo MH, mas observaram que a adição de sangue de carneiro no caldo e no ágar MH diminui a atividade antimicrobiana da AgNp. Sabe-se que proteínas adsorvem em Np quando em meio biológico, tanto *in vitro* como *in vivo*, alterando a atividade dessas partículas (Hadjidemetriou e Kostarelos, 2017; Obst et al., 2017), o que explicaria uma menor ação inibitória quando os testes são conduzidos na presença de sangue.

Outro fator de grande importância na determinação da atividade biológica de Np são as substâncias usadas na confecção dessas partículas e suas interações com o meio em que estão. Nesse experimento, foram usadas AgNp estabilizadas ou não com o polivinilpirolidina. Não foi nosso objetivo comparar o uso das diferentes Np, mas Cavassin et al. (2015) observaram que as AgNp com polivil álcool (PVA) possuem menor atividade antimicrobiana em relação a AgNp com citrato ou quitosana. Isso pode estar relacionado à maior estabilidade do sistema AgNp com PVA (um polímero sintético solúvel em água), culminando em oxidação mais lenta e menor liberação de íons Ag^+ (Cavassin et al., 2015). A ação bactericida das AgNp resulta, em parte, da ligação entre os íons de Ag e alguns componentes da membrana bacteriana, que provocam mudanças estruturais, levando à lise celular (Dehkordi et al., 2011). Desse modo, fatores que diminuem a liberação dos íons poderão diminuir a atividade antibacteriana das AgNp.

O mecanismo de ação da Ag ainda não é totalmente conhecido e sua ação é diferente em bactérias Gram negativas e positivas, pois depende da interação da Ag com os lipopolissacarídeos da membrana (culminando na formação de poros e alteração da permeabilidade e função metabólica), a espessura das membranas e outras particularidades, como composição lipídica e carga elétrica (Dehkordi et al., 2011; Paredes et al., 2014; Cavassin et al., 2015). A atividade inibitória da prata também pode estar relacionada à formação de radicais livres (Dehkordi et al., 2011) ou com interações com grupos sulfidril da parede celular (Paredes et al., 2014).

3.3.2 MIC em Ágar gel de MH

O ensaio utilizando o agar MH em cultivo bacteriano com AgNp com PVP demonstrou crescimento em todas as concentrações utilizadas, ou seja, até 7 mg/mL (**Tabela 15**). Isto confirma os resultados observados nos testes preliminares, nos quais se observou crescimento de *S. aureus* em placas contendo 10 mg/mL de AgNp sem PVP e também os dados obtidos no teste com caldo MH, no qual concentrações de até 10 mg/mL não foram capazes de inibir o crescimento microbiano. Na utilização do ágar MH houve crescimento de todas as amostras utilizadas em placas com concentrações de AgNp de três vezes superior ao observado em ágar BHI. Isso corrobora com as observações feitas na avaliação do tamanho de partículas por DLS e nas imagens de microscopia, que indicam a formação de aglomerados, sugerindo que algum constituinte deste meio de cultura dificulta a ação das AgNp sobre os microrganismos.

Tabela 15 - Crescimento de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus*, isolados de rebanhos leiteiros de MG, em ágar MH com AgNp de 100 nm com PVP em concentrações variando de 1,0 a 7,0 mg/mL.

Amostra de <i>S. aureus</i>	Concentração das nanopartículas de prata (mg/mL)			CP*
	1,0	3,0	7,0	
212	+	+	+	+
213	+	+	+	+
215	+	+	+	+
216	+	+	+	+
223	+	+	+	+
228	+	+	+	+
267	+	+	+	+
268	+	+	+	+
290	+	+	+	+
617	+	+	+	+
618	+	+	+	+
619	+	+	+	+
151	+	+	+	+
656	+	+	+	+
2243	+	+	+	+
2309	+	+	+	+
4099	+	+	+	+
4498	+	+	+	+
5329	+	+	+	+
5700	+	+	+	+
Cap. 5	+	+	+	+
Cap. 8	+	+	+	+
ATCC	+	+	+	+

3.4 Testes de toxicidade

O teste utilizando as células MAC - T demonstrou que em altas concentrações, ou seja, acima de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as células começam a morrer por compressão, pois a baixa solubilidade das AgNp utilizadas faz com que as mesmas precipitem e ocorra a compressão das células no fundo da placa (Fig. 15).

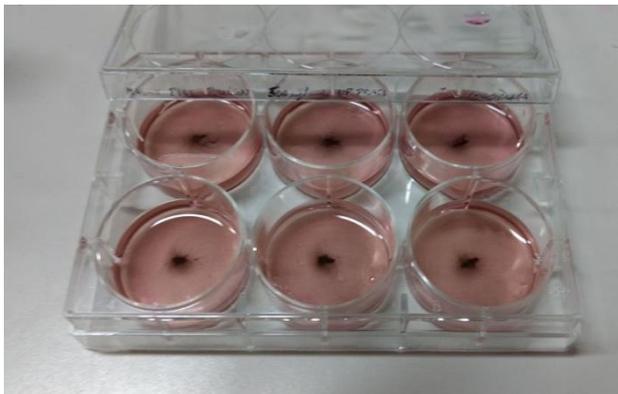


Figura 15 - Placa com células MAC-T impregnadas com AgNp na concentração de 500 mcg/mL.

De acordo com a metodologia utilizada, nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram observadas células vivas pelo microscópio. No entanto, não foi possível fazer a leitura das células tratadas com AgNp no citômetro, como foi proposto anteriormente, visto que o grande acúmulo de AgNp no fundo da placa poderia danificar o equipamento (Fig. 16).

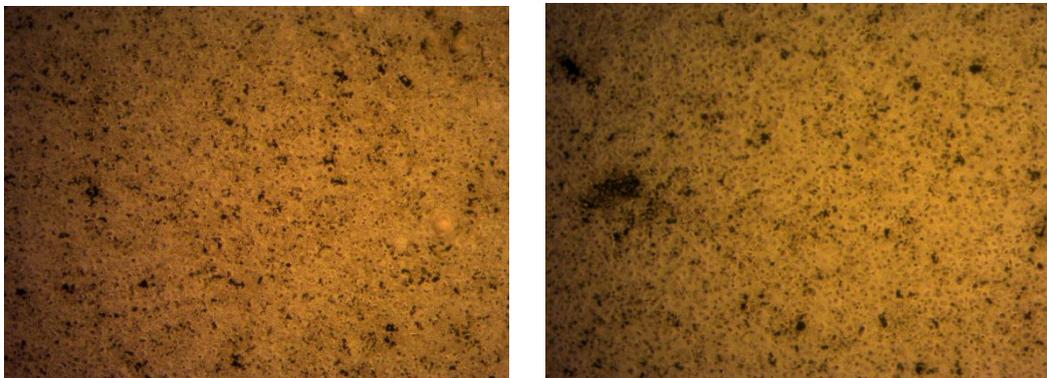


Figura 16 - Células MAC - T impregnadas com AgNp na concentração de 500 mcg/mL.

Em relação às células do controle negativo, após o preparo de acordo com a metodologia descrita por Schmid et al. (1999), a leitura no citômetro do controle detectou a grande maioria das células vivas. Contudo, não foi possível obter dados seguros em relação à viabilidade das células MAC-T apenas pela leitura em microscópio óptico, sendo necessário corar as células com Azul de Tripán a 0,4% e fazer a contagem (Figura 17, Figura 18 e Figura 19). Isto resultou em uma observação subjetiva, sugerindo que a compressão das AgNp no fundo das placas esteja matando as células MAC-T por compressão.

De acordo com Strober (1997), o teste de exclusão de corantes é usado para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão celular. Ele baseia-se no princípio de que as células

vivas possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes, como o Azul de Tripán, a Eosina ou o Propídio, enquanto que as células mortas não.

No teste utilizando o Azul de Tripán, a suspensão celular de MAC-T tratadas com AgNp foi misturada com o corante e, em seguida, examinada visualmente para determinar se as células ocupam ou excluem o corante.

O uso de cultura celular para detecção de toxicidade devem ser usados para avaliar as funções basais e especializadas da célula. No entanto, o estudo *in vivo* é essencial para confirmar os dados obtidos *in vitro* (Zhang et al., 2016).

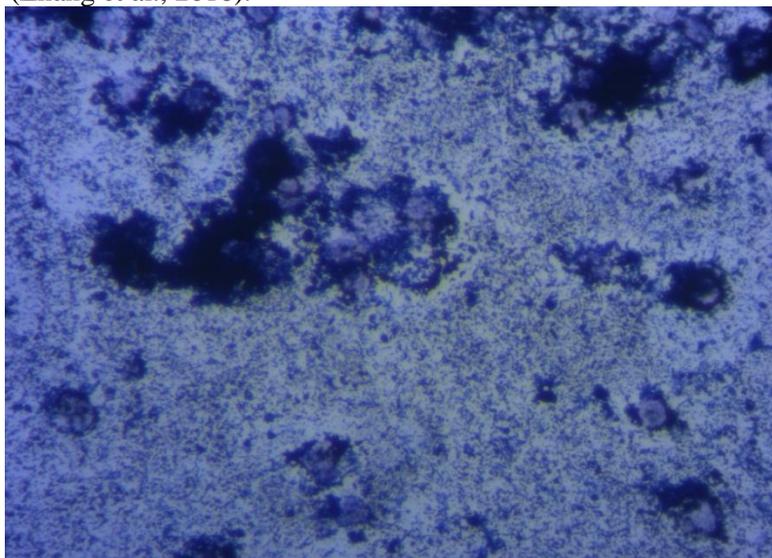


Figura 17 - Células MAC – T coradas com Azul de Tripán na concentração de 250 mcg/mL.

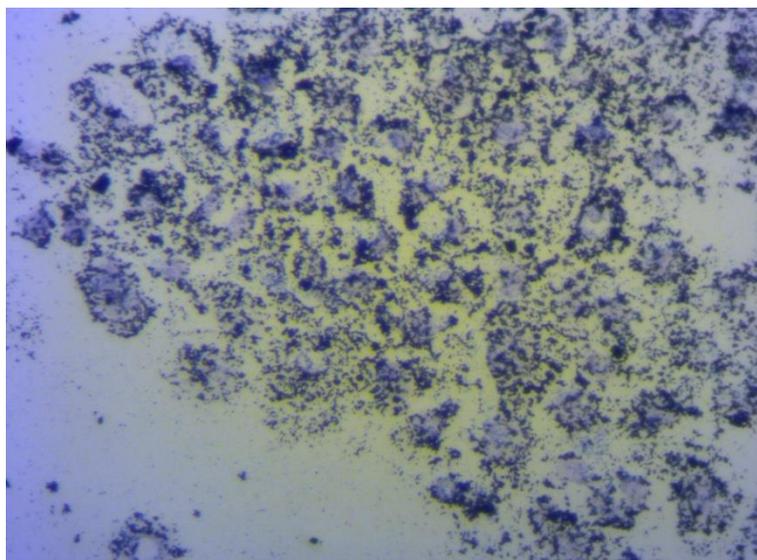


Figura 18 - Células MAC-T coradas com azul de Tripán na concentração de 500 mcg/ mL.

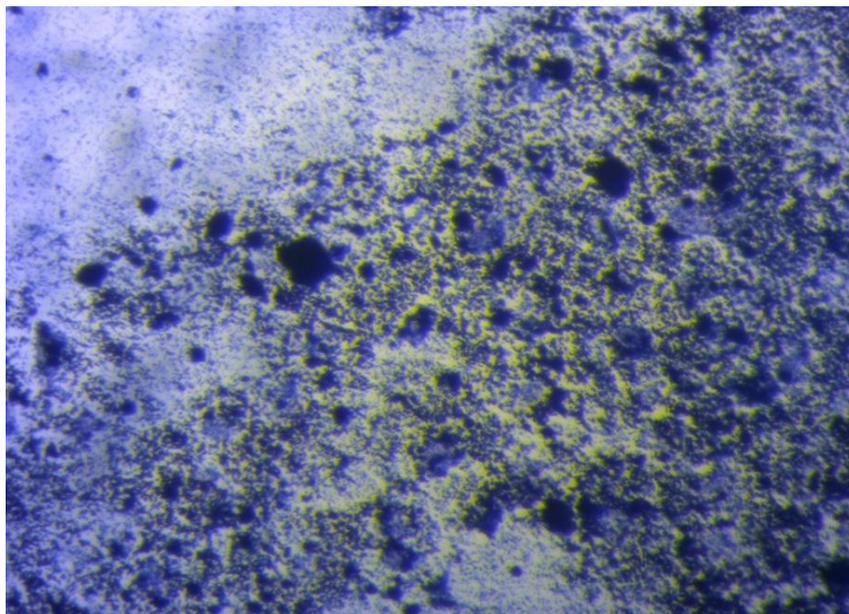


Figura 19 - Células MAC-T coradas com azul de Tripán na concentração de 750 mcg/ mL.

4 Conclusão

O CLSI sugere o uso do caldo MH como o teste padrão para avaliação de MIC utilizando amostras de *S. aureus*. Porém, os nossos resultados demonstram que esta técnica talvez não seja a mais adequada para uso com AgNp de 100 nm, independentemente do uso ou não do estabilizante PVP. Nossos achados sugerem que as AgNp não são totalmente solúveis no meio e, mesmo com o uso do PVP, não houve estabilidade em caldo MH, após a sonicação. É possível que a insolubilidade das AgNp neste meio dificulte a utilização desta técnica para avaliação da atividade antimicrobiana desse tipo de partícula. Os testes em ágar MH também não parecem ser adequados para a avaliação de AgNp.

Quando foi realizado o MIC em ágar BHI na terceira etapa dos testes, os resultados foram bastante satisfatórios com o uso das AgNp sem PVP e melhores ainda com AgNp com PVP, em que o MIC foi de 2,5 mg/mL em todas amostras de *S. aureus* usadas no teste, sendo de 2,0 mg/mL em 13 amostras avaliadas.

Em relação ao teste de toxicidade, a dificuldade de solubilização das AgNp e a sedimentação inviabilizaram os testes propostos, não sendo possível uma confirmação dos efeitos tóxicos em células MAC-T.

Pode-se concluir também que é grande a necessidade de padronização dos testes de avaliação de Np, para se obter resultados confiáveis e permitir a comparação entre diferentes materiais e estudos.

5 Referências Bibliográficas

ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really \$802 Million? **Health Affairs**, v.25, n.2, p.420-428, 2006.

AYALA-NÚÑEZ, N. V.; VILLEGAS, H. H. L.; TURRENT, L. C. I. ; PADILLA, C. R. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter. **Journal of Nanobiotechnology**, 2009.

BBC. **Por que o uso de antibióticos na criação de animais ameaça à saúde humana.** Disponível em: http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/12/151208_antibioticos_animais_rb. Acesso em: 21 de Julho de 2017.

CAVASSIN, E. D.; FIGUEIREDO, L. F. P.; OTOCH, J. P.; SECKLER, M. M.; OLIVEIRA, R. A.; FRANCO, F. F.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTO, V.; LEVIN, A. S. S.; COSTA, S. F. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. **Journal of Nanobiotechnology**, v.13, n.64, p.1-16, 2015.

CASTRO, L. A. S. **Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura - Pelotas:** Embrapa Clima Temperado, Doc. 93, 2001. 37p.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H.J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, n.176, p.1-12, 2008.

CHO, K.; PARK, J.; OSAKA, T.; PARK, S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. **Electrochimica Acta**, v.51, p.956-960, 2005.

CLSI – Clinical and laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals;** Approved Standard Fourth Edition, v.33, n.7, 2013.

DEHKORDI, S. H; HOSSEINPOUR, F.; KAHRIZANGI, A. E. An *in vitro* evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.52, p. 10795-10797, 2011.

DELÉAGE, J. P. **Historia de la Ecología: una ciencia del hombre y la naturaleza.** Montevideo: Ed. Icaria & Nordan-Comunidad, 1993.

DELOID, G.M. ; COHEN, J.M. ; PYRGIOTAKIS, G. ; DEMOKRITOU, P. Preparation, characterization, and in vitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials. **Nature Protocols**, v.12, p.355-371, 2017.

EL-KHESHEN, A. A.; EL-RAB, S. F. G. Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity. **Der Pharma Chemica**, v.4, n.1, p.53-65, 2012.

FORATTINI, O. P. Mosquitos Culicidae como vetores emergentes de infecções. **Revista Saúde Pública**, v.32, n.6, 1998.

GINGERICH, D. A. **Pharmacokinetics of Drugs used for Therapy of the Mammary Gland**, 1984.

HADJIDEMETRIOU, M. e KOSTARELOS, K. Evolution of the nanoparticle corona. **Nature Nanotechnology**, v.12, p.288-290

KATARZYNA, A.; WOLNY-KOLADKAA; MALINAB, D. K. Silver nanoparticles toxicity against airborne strains of *Staphylococcus* spp. **Journal of Environmental Science and Health, part A**, 2017.

KHEYBARI, S., SAMADI N., HOSSEINI S.V., FAZELI A., FAZELI M.R. Synthesis and antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by chemical reduction method. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.18, n.3, p.168-172, 2010.

LEVIN, B. R.; PERROT, V.; WALKER, N. Compensatory Mutations, Antibiotic Resistance and the Population Genetics of Adaptive Evolution in Bacteria. **Genetics**, v.154, n.3, p.985-997, 2000.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZGUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J.R.; FACUNDO, R. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticles Resarch**, v.10, p. 1343-1348, 2008.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. **Environmental Science Technology**, v.45, p.1177–1183, 2011.

OBST, K.; YEALLAND, G.; BALZUS, B.; MICELI, E.; DIMDE, M.; WEISE, C.; ERAVCI, M.; BODMEIER R.; HAAG, R.; CALDERON, M.; CHARBAJI, N.; HEDTRICH, S. Protein corona formation on colloidal polymeric nanoparticles and polymeric nanogels: impact on cellular uptake, toxicity, immunogenicity and drug release properties. **Biomacromolecules**, v. 18, p.1762–1771, 2017.

PAREDES, D.; ORTIZ, C.; TORRES, R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.1717–1729, 2014.

PAULSON, J. A.; ZAOUTIS, T. E. Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. **Pediatrics**, v.136, n.6, 2015.

PIRES, D.; KRAKER, M. E. A.; TARTARI, E.; ABBAS, M.; PITTET, D. Fight Antibiotic Resistance — It's in Your Hands': Call From the World Health Organization for 5th May 2017. **Clinical Infectious Diseases**, v.64, n.12, p.1780–1783, 2017.

RAI, M.; YAKA, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, n.27, p.76-83, 2009.

SADEGHI, B.; GARMAROUFI, F. S.; HASHEMI, M.; NEZHAD, H. R.; NASROLLAHI, A.; ARDALAN, S.; ARDALAN, S. Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. **Advanced Powder Technology**, v.23, p.22–26, 2012.

SCHMID, L.; FERBAS, J.; UITTENBOGAART, C.H.; GIORGI, J.V. Flow cytometric analysis of live cell proliferation and phenotype in populations with low viability. **Cytometry**, v.35, n.1, p.64-74, 1999. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=AbstractPlus&list_uids=10554182

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, A.3B.1-A.3B.2, 1997.

THOMAS, P.; VAN BOECKELA.; BROWERB, C.; GILBERTC, M. D.; BRYAN, T.; GRENFELLA, E. F.; SIMON, A.; LEVINA, G. H.; TIMOTHY, P.; ROBINSONI, A.; TEILLANTA, E.; LAXMINARAYANB, R. E. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.18, p.5649–5654, 2015.

WOOLHOUSE, M.; WARD, M.; VAN BUNNIK, B.; FARRAR, J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**: 370, 2015.

YUAN, Y.; PENG, O.; GURUNATHAN, S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.569, 2017.

ZHANG, X. F.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.1603, 2016.

Capítulo 2: Validação de metodologia para detecção de nanopartículas de prata em leite por Espectrometria de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES)

1 Introdução

O Brasil, atualmente, é o quinto maior produtor de leite do mundo. Com uma produção estimada em 2017 em 34.997.000 toneladas, apresentou crescimento de 1% em relação aos 34.650.000 t toneladas produzidas em 2016, aumento esperado após dois anos de queda na produção (CONAB, 2017). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), embora o Brasil esteja atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China, ainda não é auto-suficiente (Brasil, 2016).

O crescimento da produção vem acompanhado de redução do número de fazendas e animais ordenhados e de intensificação dos sistemas de produção. Observa-se menor número de vacas com maior produção, o que torna o rebanho mais produtivo e mais susceptível a uma série de patologias, entre estas, a mastite.

A intensificação dos sistemas de produção gera maior uso de medicamentos, o que contraria a tendência mundial de diminuição do uso de antimicrobianos nos animais, devido aos riscos inerentes à resistência e à contaminação dos produtos de origem animal.

Na busca por novos compostos para substituição dos antimicrobianos convencionais, houve maior uso de produtos em forma de nanopartículas destinados à produção animal nos últimos anos. Entre estes, destaca-se a Ag em forma de AgNp.

Nos últimos anos, diversos produtos usando Ag, seja na forma metálica ou iônica, administrada de forma tópica, como agente bacteriano têm sido lançados no mercado e vêm ganhando popularidade diante da propagação de bactérias resistentes a antimicrobianos, como é o caso de *S. aureus* (Santana, 2012).

Apesar do crescente interesse, ainda não existe uma legislação a respeito dos limites da Ag em alimentos. O *Food and Drug Administration* (FDA) não permite o uso da Ag coloidal em animais de produção. A *United States Environmental Protection Agency* (EPA) propôs uma aprovação condicional de AgNp para utilização como antimicrobiano [EPA-HQ-OPP-2009-0936; FRL-8806-9], criando assim, o potencial para a futura regulamentação e/ou níveis de tolerância dentro de gêneros alimentícios (Mudalige e Linder, 2013).

Existem vários relatos na literatura do uso da Ag contra infecções como a mastite (Dehkordi et al., 2011). Nos últimos anos, vem crescendo também o uso em produtos como sanitizantes para ordenhadeiras, tanques de expansão ou equipamentos de laticínios (Stanga, 2010) e até como revestimentos de embalagens para melhorar e aumentar a vida de prateleira do leite pasteurizado (Fapesp, 2015).

Entre as várias técnicas que podem ser utilizadas para a detecção de Ag no leite, destaca-se a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), que é amplamente utilizada em análises laboratoriais para detecção de vários minerais, por permitir

análises multielementares simultâneas, ter sensibilidade, alta precisão, rapidez e uma ampla faixa dinâmica linear. Porém, não existe uma metodologia utilizando o ICP OES validada para este fim.

O objetivo deste capítulo foi primeiramente determinar a sensibilidade do ICP OES para detecção de AgNp. Em seguida, desenvolver uma metodologia de digestão de amostras de leite para análise e, principalmente, validar a técnica usando o ICP OES, seguindo as normas estabelecidas pelos órgãos reguladores nacionais (Brasil, 2011a; Brasil, 2011b, INMETRO, 2016; Anvisa, 2017) e internacionais (ICH, 1996).

2 Material e Métodos

2.1 Determinação da sensibilidade do equipamento

Primeiramente, foram feitos vários ensaios avaliando a sensibilidade do equipamento (ICP – OES Perkin Elmer Optima™ 7000 DV) (PerkinElmer, Inc. 940 Winter Street Waltham, MA 02451 USA) na determinação de AgNp em leite.

Coletou-se 1,5 L de leite diretamente de uma vaca na fazenda do Centro Nacional de Gado de Leite da Embrapa em Coronel Pacheco - MG. O leite foi coletado por ordenha manual após o uso do pré-dipping com solução de iodo glicerinado e desinfecção com álcool 70°. O leite foi colocado em garrafas de vidro esterilizadas e acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável e encaminhado diretamente para o Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.

Coletaram-se água de consumo das vacas e uma amostra da dieta (silagem de milho, feno de tifton, fubá de milho, farelo de soja, soja grão e mistura mineral) para serem encaminhadas ao Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, para posterior digestão e análise para verificação de possíveis resíduos de prata.

No laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite, coletaram-se duas alíquotas de 40 mL do leite, sendo uma amostra para fazer análise da composição e CCS e outra amostra para CBT. As amostras de leite foram analisadas quanto aos teores de gordura, proteína e contagem de células somáticas no equipamento eletrônico CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda) que combina o princípio de Transformada de Fourier no infravermelho médio e citometria de fluxo, respectivamente. As análises para determinação da composição do leite foram realizadas segundo IDF (2000) e a contagem de células somáticas segundo IDF (1995).

Uma alíquota de 50 mL do leite oriundo da fazenda foi colocada em tubos Falcon e centrifugado a 17.300 G a uma temperatura de 4°C por 30 minutos para separação do soro, sendo produzido 30 mL de soro de leite.

Para a verificação da sensibilidade do equipamento ICP - OES a ser utilizado para análise e construção de uma curva de calibração antes do início dos testes de validação, realizou-se um pool de seis amostras em duplicata em tubos digestores de 75 mL. Para tal, pesaram-se 30 mg de AgNp pura Sigma-Aldrich (cat. n° 576832 - Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de 100 nm, em balança de precisão Shimadzu Modelo AUW 220 D (Maryland 21046, U.S.A.), que foram adicionadas em 3 mL de soro de leite. Esta suspensão foi sonicada em equipamento (Hielscher

UP 200 S, (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha) potência 300 W, ciclo de 0,5 e amplitude de 70%) em banho de gelo e, em seguida, foram colocados mais 3 mL de soro de leite e feita nova sonicação. Após a diluição da AgNp, a suspensão foi completada para 30 mL com leite puro. Em seguida, foi feita a correção para um conjunto de tubos em duplicata, sendo para cada amostra, usados um tubo com 10 mL e outro com 20 mL da suspensão. As amostras compostas por soro e leite fortificadas ficaram com as seguintes concentrações de AgNp: 0,995 mg/mL; e após diluições seriadas para 9.950 ppb; 995 ppb; 99,5 ppb; 9,95 ppb, 0,995 ppb e 0,0995 ppb. Os tubos com as diluições foram incubados para a estufa a 105°C por 24 horas.

Após a secagem, adicionaram-se 5 mL de HNO₃ no precipitado de todos os tubos e posteriormente foram levados para o aquecimento em um bloco digestor até a temperatura de 150° C por 2 horas. Após a digestão, nos tubos com 20 mL foram acrescidos 2 mL de HClO₄ e em seguida, feito novo aquecimento a 150° C por uma h.

Após os processos de aquecimento e digestão, todos os tubos foram reconstituídos com água deionizada por osmose reversa, até o volume de 25 mL. A solução foi filtrada em papel filtro qualitativo de 28 µm e funil de 50 mm, e armazenadas em frascos Pleion de 40 mL.

Em seguida, fez-se a injeção das soluções no equipamento de ICP OES, com leitura realizada em dois comprimentos de onda em modo axial (328,068 nm e 338,289 nm).

Para descobrir o intervalo da curva de calibração mais adequado, fez-se uma segunda etapa com diluições mais apropriadas à sensibilidade do equipamento, utilizando uma alíquota de 3 mL de soro de leite com 0,5 mg de AgNp e sonicação, como descrito anteriormente. Para homogeneizar a suspensão por um período de 10 min, após a sonicação com o soro, foram acrescidos mais 3 mL de leite e feita nova sonicação por mais 10 min. Terminando a homogeneização, a suspensão foi completada para 10 mL (processo descrito anteriormente), resultando em uma concentração de 0,0199 mg/mL (19,9 ppm). Logo após, foram feitas diluições seriadas para as concentrações de 796 ppb; 31,84 ppb; 15,92 ppb; 2,5472 ppb; 1,2736 ppb e 0,04975 ppb.

Os tubos digestores de 75 mL com 10 mL da suspensão foram colocados em estufa a 105 °C para secagem por 24 h. Então, o precipitado foi digerido utilizando 5 mL de HNO₃ e 2 mL de HClO₄, como descrito anteriormente. Em seguida fez-se injeção das soluções no equipamento de ICP OES e a leitura realizada em dois comprimentos de onda em modo axial (328,068 nm e 338,289 nm).

Para confirmação dos resultados encontrados na primeira análise, utilizando-se apenas ácido nítrico, foi refeita a injeção das amostras de 0,398 mg/mL; 39,8 ppb e 3,98 ppb com dez repetições de cada uma, para confirmar o melhor ponto de leitura do equipamento e construção da curva de calibração.

2.2 Determinação do método de digestão

Para determinação do melhor método de digestão (extração), coletaram-se dois litros de leite da vaca n° 8145 do estabulo de Gado Puro da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco – MG (CNPGL – Coronel Pacheco – MG). A coleta, armazenamento e transporte foram realizadas conforme descrito anteriormente. Duas amostras de 40 mL foram coletadas em frascos Pleion e

encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, para análise de CCS, CBT e composição.

Uma alíquota do leite foi usada para produção de soro de leite, conforme descrito anteriormente, produzindo 30 mL de soro de leite.

Para construção das amostras, pesaram-se 10 mg de AgNp (Sigma-Aldrich, cat. n° 576832 - Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de tamanho médio de 100 nm, conforme descrito anteriormente, e adicionadas em 30 mL de soro de leite em um tubo Falcon de 50 mL. Sonicou-se a suspensão por uma hora em equipamento de ultra-som Hielscher UP 200 S (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha), potência 300 W, ciclo de 0,7 e amplitude de 100%, em banho de gelo. Em seguida, a suspensão de AgNp em soro de leite foi acondicionada em um balão de 100 mL e completado o volume com leite, formando uma suspensão de 10 mg/100 mL ou 100.000 ppb, corrigida para 99.500 ppb, chamada de solução Stock 01. A suspensão de 99.500 ppb foi diluída em leite para 4,975 ppb em quatro balões de 10 mL e uma amostra apenas de leite (branco) em um balão de 10 mL, totalizando cinco balões, dos quais foram transferidas para tubos digestores de 75 mL.

Em seguida, quatro amostras dos tubos digestores de 75 mL (incluindo o branco) foram encaminhadas para secagem em estufa a 105°C por 24 h. Um quinto tubo digestor de 75 mL, com uma amostra de 4,975 ppb, ficou como reserva. Após a secagem realizaram-se três tipos de digestão (extração) da matriz leite:

Tubo 1 – Digestão com HNO₃ (5 mL)

Tubo 2 - Digestão com HNO₃ (5 mL) + H₂O₂ (1 mL)

Tubo 3 - Digestão com HNO₃ (5 mL) + HCl (2 mL)

Branco - Digestão com HNO₃ (5 mL) + H₂O₂ (1 mL)

A digestão foi realizada em bloco digestor a uma temperatura de 100 °C por 1:30 h. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 130° C por 30 min e depois a 150° C por 1:00 h.

As suspensões foram digeridas e filtradas em papel filtro qualitativo de 28 µm e funil de 50 mm, e armazenadas em frascos Pleion de 40 mL. Cada amostra filtrada em papel filtro foi dividida em dois frascos Pleion, sendo que a segunda amostra de cada frasco foi filtrada novamente em filtro de 0,22 µm com uma seringa de 10 mL, totalizando oito amostras (quatro com apenas uma filtragem e quatro com duas filtragens).

Para calibração do equipamento de ICP OES e realização das leituras, foram preparadas soluções padrão, utilizando a “Solução Padrão ICP Prata 1000 mg/L”, diluídas em água deionizada por osmose reversa e acrescidas com 2% de HNO₃, formando as suspensões com 1 ppm; 5 ppm; 10 ppm e um branco para comprovação da calibração do equipamento.

As soluções digeridas e as soluções padrão ICP foram injetadas no equipamento de ICP-OES, totalizando 12 amostras:

- quatro Soluções digeridas e filtradas com papel filtro 28 µm;
- quatro digeridas e filtradas com papel filtro 28 µm e filtro 0,22 µm;
- quatro Soluções padrão ICP (1 ppm; 5 ppm; 10 ppm e um branco) usadas para comprovação da calibração do equipamento.

Foi feita a leitura na configuração em modo axial (328,068 nm e 338,289 nm).

Posteriormente, utilizando a solução reserva que estava em um balão de 10 mL, fez-se a digestão desta amostra reserva, utilizando os mesmos padrões da digestão anterior com $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, usando apenas uma filtragem em com papel filtro 28 μm , e na configuração 328.068 nm.

Tubo reserva- Digestão com HNO_3 (5 mL) + HClO_4 (2 mL)

2.3 Validação da metodologia de análise de AgNp em leite

2.3.1 Seletividade e especificidade

Para comprovar que o método é confiável para determinar a presença do analito na presença da matriz (excipiente) sem interferência de contaminantes. Coletou-se 1 litro de leite de uma vaca do estábulo de Gado Puro do Centro Nacional de Gado de Leite da Embrapa em Coronel Pacheco – MG (CNPGL – Coronel Pacheco – MG). Após o resfriamento e transporte, retirou-se uma alíquota de 40 mL em um fraco Pleion que foi imediatamente encaminhada ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, para análise de CCS, CBT e composição.

A amostra do leite coletada foi encaminhada ao Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG e processada. Foram preparados 40 mL de soro de leite seguindo a mesma metodologia descrita no item 2.1. Em seguida pesaram-se 10 mg de AgNp pura Sigma-Aldrich (cat. n° 576832- Merck KGaA, Darmstadt, Germany de 100 nm, em balança de precisão Shimadzu Modelo AUW 220 D (Maryland 21046, U.S.A.) e 10 mg de Nanopartículas de Óxido de alumínio (AlNp) (< 50 nm) Sigma-Aldrich (cat. n° 544833 - Merck KGaA, Darmstadt, Germany). As duas nanopartículas foram solubilizadas juntas em 30 mL do soro de leite obtido por centrifugação em um tubo Falcon de 50 mL para preparo de uma suspensão mãe (Stock 1). A suspensão com as duas nanopartículas foi sonicada por uma hora em equipamento (Hielscher UP 200 S (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha), potência 300 W, ciclo de 0,5 e amplitude de 70%) em banho de gelo. Após serem sonicadas, acrescentaram-se 70 mL de leite na suspensão. Formou-se uma suspensão com a concentração de 99.500 ppb de AgNp e 99.500 ppb de AlNp. Após o preparo da suspensão mãe (Stock 1), retirou-se 0,5 mL com uma pipeta que foi dispensado em um balão de 10 mL de leite, fazendo uma solução Stock 02 (4.975 ppb). Em seguida, pipetou-se 1 mL da suspensão Stock 02, que foi dispensado em um balão de 100 mL, formando uma suspensão de 49,75 ppb, com seis réplicas de 10 mL em tubos digestores de 75 mL (**Figura 20**).

Da mesma forma, prepararam-se cinco amostras apenas de uma suspensão com AgNp que foram acondicionadas em tubos digestores de 75 mL, seguindo a mesma metodologia citada anteriormente. Para o branco, amostras apenas de leite (seis amostras de 10 mL) foram preparadas e acondicionadas em tubos digestores de 75 mL. No total, prepararam-se 17 amostras de 10 mL (seis com AgNp + AlNp; cinco apenas com AgNp e seis com o branco) que foram encaminhadas para estufa a 105° C por 24 h. Após a secagem adicionaram-se 5 mL de HNO_3 em cada tubo para fazer uma pré-digestão durante 12 h.

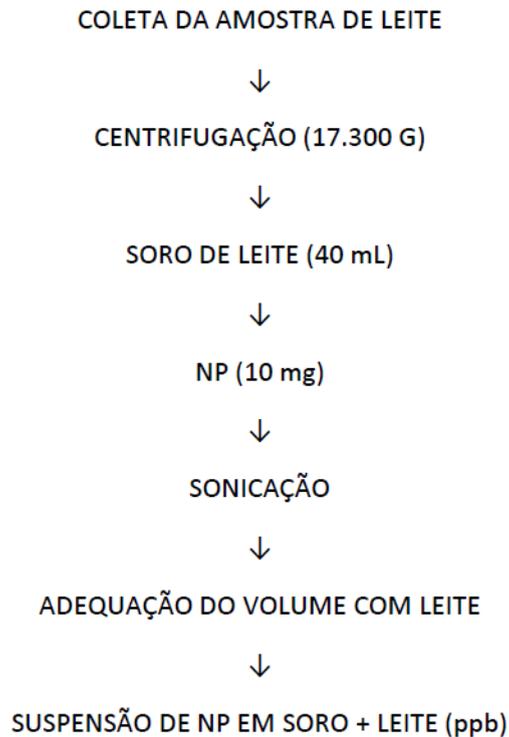


Figura 20 - Fluxograma de preparo das amostras de leite da coleta até a suspensão das NP em soro + leite.

Após a pré-digestão em HNO_3 , as amostras foram colocadas em bloco digestor a 110°C para a digestão por um período de 1:30 h; em seguida, a temperatura foi aumentada para 150°C . Após uma hora a 150°C , adicionou-se 1 mL de HCl e mais aquecimento a 150°C por 30 min. Em seguida, adicionou-se mais 1 mL de HCl e mais aquecimento a 150°C por 30 min, totalizando 3:30 h de digestão.

Após o resfriamento, ressuspenderam-se as amostras com água deionizada por osmose reversa para completar 10 mL. Fez-se a filtragem em papel filtro qualitativo $28\ \mu\text{m}$ em funil de vidro de 50 mm, e acondicionamento em frascos Pleion de 40 mL (**Figura 21**).

TUBOS DIGESTORES DE 75 mL COM AMOSTRAS

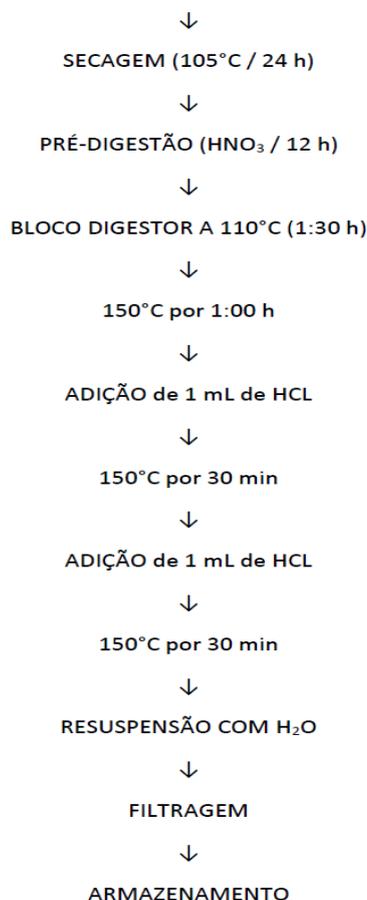


Figura 21 - Fluxograma das amostras de leite da secagem até o armazenamento.

A leitura no ICP–OES foi realizada na configuração de 1.400 W de potência, vazão do gás auxiliar de 0,2 l/min e nebulização do plasma de 0,8 L/min, modo Axial e comprimento de onda de 328,068 nm.

Os resultados foram comparados após serem submetidos à análise de variância, sendo o sinal emitido pelo equipamento ICP-OES, a variável analisada, e o teste SNK (Student-Newman-Keuls) usado para comparação das médias.

2.3.2 Linearidade

Para construção de uma curva linear, utilizou-se o leite coletado no CNPGL – Coronel Pacheco – MG, seguindo a metodologia citada anteriormente para formação de uma solução Stock com AgNp. Utilizou-se a solução Stock 01 (99.500 ppb). Pipetou-se 0,5 mL que foi dispensada em um balão de 100 mL de leite, fazendo uma solução Stock 02 (497,5 ppb). Em seguida, pipetou-se 0,5 mL da solução Stock 01 e dispensou em um balão de 10 mL, formando a solução Stock 03 (4.975 ppb).

A partir das soluções Stock 02 e 03, prepararam-se 18 amostras de 10 mL em tubos digestores de 75 mL (triplicata) dos seis pontos para construção de uma curva, e fez-se uma amostra em triplicata com uma solução apenas de leite, chamada de Branco.

1° Ponto: 2,49 ppb
2° Ponto: 4,98 ppb
3° Ponto: 9,95 ppb
4° Ponto: 24,88 ppb
5° Ponto: 49,75 ppb
6° Ponto: 99,5 ppb
Branco

Os 21 tubos digestores de 75 mL foram incubados em estufa a 105°C por 24 h. Após a secagem, foi feita uma pré-digestão com HNO₃ por 12 h, e digestão em bloco digestor associado ao HCl e aquecimento. Após o processo de digestão, acondicionamento em frascos Pleion de 40 mL, fez-se a leitura em equipamento de ICP OES, seguindo a mesma metodologia citada anteriormente.

Para a construção da curva de calibração, as leituras de intensidade do sinal foram transcritas para o programa de estatística SPSS onde foi feita análise de regressão linear, de variância e teste de homocedasticidade pelo teste de Levene.

2.3.3 Precisão

Para determinar a precisão do equipamento, fizeram-se duas leituras com intervalo de um dia, em 18 amostras nas concentrações de 4,98; 49,75 e 99,5 ppb, com leite coletado no CNPGL – Coronel Pacheco – MG, seguindo a mesma metodologia de digestão descrita anteriormente. Após a leitura das amostras em equipamento de ICP OES, fez-se um cálculo por fórmula matemática, em função do desvio padrão relativo (DPR) (INMETRO, 2016; Anvisa, 2017).

$$\text{DPR} = \text{DP} / \text{CMD} \times 100$$

2.3.4 Limite de detecção

Para o limite de detecção, fez-se a análise de 24 replicatas da matriz branca (somente leite) e os valores obtidos foram utilizados para calcular o LD, seguindo a fórmula:

$$\text{LD} = 3 \times s$$

Sendo:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca (n > 20).

2.3.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido em função da fórmula:

$$\text{LQ} = 10 \times s$$

Sendo:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca (n > 20).

2.3.6 Acurácia

A leitura para determinação da acurácia foi realizada utilizando-se amostras com três diferentes concentrações: 15 amostras de 2,49 ppb; 15 amostras de 49,75 ppb e seis amostras de 99,5 ppb. Para tal utilizou-se o leite descrito na Tabela 18, seguindo a mesma metodologia de preparo e digestão descritos anteriormente. O cálculo foi de acordo com a fórmula sugerida por Brasil (2011a); Brasil (2011b).

$$\text{Frec} = \text{Cf} - \text{Cnf} / \text{Cad} \times 100$$

Sendo:

Cf = concentração medida após fortificação da matriz branca;

Cnf = concentração medida na matriz branca não fortificada, i.e., antes da fortificação;

Cad = concentração do analito puro adicionado à matriz branca.

2.3.7 Robustez

Para avaliação da robustez do método, seguindo as orientações de Brasil (2011a) e Brasil (2011b), utilizou-se o leite coletado no CNPGL – Coronel Pacheco – MG para o teste de seletividade e acurácia. Para tal, seguiram-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para preparo de oito amostras em duplicata na concentração de 49,75 ppb, distribuídas em 16 tubos digestores de 75 mL da seguinte forma:

- Primeiro grupo (oito amostras): congelado a -18°C por 24 h;
- Segundo grupo (oito amostras): refrigerado por 24 h a 6°C.

Após 24 h de armazenamento (resfriadas/congeladas), as amostras foram colocadas em estufa para secar e em seguida, para a digestão seguindo a metodologia descrita anteriormente para preparo das amostras para Linearidade, com algumas adaptações para determinar a robustez. Tanto as amostras que foram congeladas, quanto as refrigeradas, foram divididas em grupo com pré-digestão em HNO₃ de 6 h (quatro amostras) e grupo com pré-digestão em HNO₃ de 12 h (quatro amostras). Os grupos com diferentes tempos de pré-digestão foram divididos em um grupo com volume de 9,5 mL (duas amostras) e outro com 10,5 mL (duas amostras) e em seguida, foram divididos em função do tempo de digestão no bloco digestor com 3 h (uma amostra) e 4 h (uma amostra).

Após a digestão, as amostras foram filtradas e acondicionadas em frascos Pleion de 40 mL, seguindo a metodologia descrita anteriormente para a Linearidade.

A avaliação da robustez do método foi feita pelo Planejamento de *Youden* (2002/657/EC) e o teste F para confirmação da variância, em que as condições de análise propostas pelo método, descritas anteriormente, foram alteradas para mais (+) ou para menos (-). O resultado das leituras avalia a intensidade do sinal em função dos diferentes efeitos sobre o método, seguindo o padrão descrito abaixo:

Efeito A - Tempo de digestão: 3 h (+) / 4 h (-)

Efeito B – Tempo de pré-digestão: 12 h (+) / 06 h (-)

Efeito C – Volume da amostra: 9,5 mL (-) / 10,5 mL (+)

Efeito D – Armazenamento da amostra: Congelado (+) / Resfriado (-)

2.4 Comparação entre leites com diferentes concentrações de sólidos

Coletaram-se dois litros de leite de uma vaca primípara (animal n° 166) do rebanho do IFMG – Campus Bambuí – MG, seguindo os procedimentos de coleta, transporte e armazenamento descritos anteriormente. O leite coletado foi dividido em quatro alíquotas de 500 mL e cada uma das amostras foi alterada para haver uma diferenciação entre os valores de gordura (G) e proteína (P), da seguinte forma:

Amostra A: leite integral (sem alterações);

Amostra B: leite desnatado por processo de centrifugação em Tubos Falcon de 50 mL em centrífuga SISLAB Twister (São Paulo, SP, Brasil) a 1.800 G por 30 minutos;

Amostra C: leite evaporado por condensação em um balão volumétrico de 50 mL em Evaporador rotativo TE – 211 Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil), por um período de 30 min a 55° C e 5 rpm;

Amostra D: leite diluído com 20% de água deionizada por osmose reversa.

Após a diferenciação de cada alíquota de leite, foi coletada uma amostra de cada, para análise de CCS, CBT e composição no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG.

Seguindo a mesma metodologia utilizada anteriormente, fez-se uma suspensão de AgNp e a partir das soluções Stock, diluíram-se em balões com três concentrações (4,98; 49,75 e 99,5 ppb) para cada uma das quatro amostras, com sete repetições, formando 84 amostras de 10 mL em tubos digestores de 75 mL.

4,98 ppb (Amostra A; B; C e D)

49,75 ppb (Amostras A; B; C e D)

99,5 ppb (Amostras A; B; C e D)

As amostras foram encaminhadas para secar na estufa e para o processo de digestão e armazenamento, de acordo com metodologia descrita anteriormente.

A leitura das amostras foi feita em equipamento de ICP – OES e a eficácia do método para diferentes tipos de leite, avaliada pela intensidade do sinal gerado de acordo com a concentração de prata na amostra, calculada pelo Teste t de Student.

2.5 Verificação da presença de Ag em amostras de leite acondicionadas em embalagens de polietileno com AgNp

Para verificar se havia migração de Ag em amostras de leite acondicionadas em embalagens de polietileno misturadas a AgNp, seis garrafas de leite, em embalagens de polietileno misturada a AgNp, foram adquiridas em supermercado no estado de São Paulo, sendo três de leite integral e três de leite desnatado. Cada garrafa foi fracionada em quatro alíquotas, totalizando 24 amostras, com cada garrafa de lote e data de validade diferentes.

Uma alíquota de 10 mL de cada uma das 24 amostras foi acondicionada em tubos de digestão de 75 mL e encaminhadas para secar em estufa a 105°C. Após 24 h, acrescentou-se HNO₃ para pré-digestão e depois de 12 h digestão em bloco digestor com aquecimento, foi adicionado HCl. Em

seguida, filtragem e armazenamento para leitura em equipamento de ICP OES, conforme metodologia já descrita anteriormente para o processo de validação.

As embalagens de polietileno misturadas a AgNp foram picotadas em pequenos pedaços. Pesou-se 1 g de cada amostra de embalagem (total de seis amostras) que foi acondicionado em tubos digestores de 75 mL. Em seguida, adicionaram-se 20 mL de H₂SO₄ para uma pré-digestão. Após as 12 h de pré-digestão, os tubos foram encaminhados para o bloco digestor e aquecidos a uma temperatura de 300°C por 45 minutos. Após o resfriamento, houve novo aquecimento por cinco minutos e o acréscimo de 5 mL de H₂O₂ a 30%, e depois de mais cinco minutos de aquecimento foram adicionados mais 5 mL de H₂O₂ a 30%, de acordo com metodologia adaptada de Ernst et al. (2000).

Para a leitura das amostras, fez-se uma curva de validação com cinco pontos, de acordo com o processo de validação, que exige uma linearidade de no mínimo cinco pontos, com as concentrações de 4,98; 9,95; 49,75; 74,63; 99,5 ppb e o branco. A construção da curva para leitura das amostras foi realizada com uma alíquota de leite coletada de uma vaca do estábulo de gado puro do Centro Nacional de Gado de Leite da Embrapa Gado de leite em Coronel Pacheco – MG. A análise da qualidade do leite foi realizada no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora-MG.

As amostras de leite para construção da curva utilizada na leitura das amostras coletadas em São Paulo foram digeridas de acordo com metodologia descrita anteriormente para a validação referente ao item linearidade.

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação da sensibilidade do equipamento

A composição e a qualidade do leite utilizado na determinação da precisão do equipamento utilizado na determinação do equipamento estão descritas na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Resultado da análise do leite utilizado na determinação da precisão do equipamento, realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.

Vaca	CCS (cél x 1.000/mL)	G (g/100g)	P (g/100g)	Lac (g/100g)	EST (g/100g)	ESD (g/100g)	CBT (cél x 1.000/mL)
8145	1.433	2,85	3,18	4,74	11,77	8,92	526

A sensibilidade do equipamento de ICP - OES em detectar AgNp em seis amostras de leite fortificadas com concentrações de 9.950 ppb; 995 ppb; 99,5 ppb; 9,95 ppb, 0,995 ppb e 0,0995 ppb nos comprimentos de onda (328,068 nm e 338,289 nm) foi muito variável e apresentou desvio padrão muito alto. A linearidade para validação de uma metodologia não deve ter um desvio padrão superior a 2% (ICH, 1996; Brasil, 2011a; Brasil, 2011b; Anvisa, 2017). Os dados sugerem que o valor da intensidade do sinal pode ter variado em função da digestão das amostras. O uso apenas do HNO₃ e do HNO₃ + HClO₄ não digeriu a gordura de maneira satisfatória, mesmo em leite relativamente magro, com teor de gordura abaixo de 3%, uma vez que após o processo de filtragem, observou-se muita gordura no papel filtro utilizado. A grande presença de gordura no filtro foi determinante para definir que novos métodos de digestão deveriam ser testados e que

não ficou claro o melhor ponto de sensibilidade do equipamento, sendo que as leituras mais estáveis ficaram abaixo de 9,95 ppb.

Em relação às amostras com volume de 20 mL de suspensão, comprovou-se que um maior volume de leite dificulta o processo de secagem e, conseqüentemente, interfere na digestão das amostras. Portanto, o volume mais adequado para um processo de secagem e digestão da amostra é de 10 mL, para cada tubo digestor de 75 mL.

Após novas análises nas concentrações de 0,398 mg/mL (398.000 ppb); 39,8 ppb e 3,98 ppb, foi demonstrado que o melhor limite de detecção do equipamento ficou entre os valores de 39,8 ppb e 3,98 ppb, e que a melhor leitura era obtida no comprimento de onda de 328,068 nm, confirmando a recomendação de comprimentos de onda e limites estimados de detecção sugerida pelo METHOD 6010 B (1996). Porém, novos testes devem ser feitos com diferentes métodos de digestão para melhorar a intensidade e qualidade do sinal.

Para verificação da sensibilidade do equipamento utilizado para leitura das amostras, o ICP OES demonstrou eficácia e precisão mínima até a concentração de 0,4975 ppb, ou seja, a mais baixa utilizada nos testes preliminares.

3.2 Determinação do método de digestão

Para determinação do melhor método de digestão, a amostra de leite utilizada foi analisada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, e os resultados estão descritos na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Resultado da análise do leite utilizado na determinação da digestão do leite realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG.

Vaca	CCS (cél x 1.000/mL)	G (g/100g)	P (g/100g)	Lac (g/100g)	EST (g/100g)	ESD (g/100g)	CBT (cél x 1.000/mL)
8145	79	1,8	3,18	4,79	10,69	8,89	46

Quatro amostras de 4,975 ppm foram extraídas em dois comprimentos de onda (328,068 nm e 338,289 nm) para confirmar o melhor comprimento de onda em diferentes metodologias de digestão.

De acordo com a Tabela 18, verifica-se que as digestões realizadas utilizando HNO₃ + HCl resultaram em sinal muito mais intenso com desvio padrão menor que 2%, dez vezes mais forte do que o sinal gerado apenas pela digestão com HNO₃. Em um processo de validação, um baixo valor do desvio padrão é importante, pois mostra que a metodologia gera resultados mais estáveis e que serão mais lineares.

Khan et al. (2013) realizaram um estudo com o objetivo de validar um método analítico para a determinação simultânea de cromo (Cr), molibdênio (Mo) e selênio (Se) em fórmulas infantis de leite em pó, e comparar variados métodos de secagem e digestão. Os resultados mostraram que a digestão ácida úmida e os métodos de micro-ondas fornecem resultados satisfatórios para a preparação de amostra para leitura em ICP OES e ICP MS.

Nossos achados estão em conformidade com dados da literatura e demonstram que o uso do HNO_3 é uma boa opção. Na digestão úmida, a matéria orgânica é destruída usando-se ácidos ou oxidantes (como H_2O_2 , KMnO_4 , KClO_4) (Amaro-López et al., 1996). Outros autores recomendam o HNO_3 , que pode ser associado ao H_2SO_4 , HClO_4 ou ao H_2O_2 (Hoening e Kersabiec, 1996) no processo de digestão úmida. Porém, o uso somente de HNO_3 na digestão úmida é insuficiente para oxidar completamente amostras com alto teor de proteína ou gordura, como o leite (Kira, 2002). Portanto, em matrizes ricas em gorduras e óleo, os métodos de digestão mais eficientes são os que se baseiam numa extração ácida, na qual os metais são extraídos da matriz enquanto a amostra é deixada em contato com solução diluída de HNO_3 ou HCl sob ebulição (Skurikhin, 1993).

Da mesma forma, em vários trabalhos é citado o uso do H_2O_2 no processo de digestão. Naozuka et al. (2003) avaliaram Cl, Br e I por ICP OES e relataram bons resultados com a utilização de HNO_3 e H_2O_2 juntamente com a digestão por micro-ondas em leite. Os resultados descritos na Tabela 21 demonstram que o uso do H_2O_2 gera um sinal mais intenso, com 266684,3 cps de intensidade, resultado maior do que o encontrado na digestão por $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$ (2126113,3), e com um desvio padrão muito mais elevado, sendo 6,16% e 1,72% respectivamente. Porém, em um processo de validação, o desvio padrão médio dos resultados deve ser inferior a 2%.

Em relação ao preparo da matriz ácida, os trabalhos citados na literatura demonstram que o uso de bloco digestor ou forno micro-ondas não interferem nos resultados. Kira (2002) avaliou diferentes procedimentos de preparo de amostra (digestão por via seca, digestão por via úmida em chapa elétrica e em forno de micro-ondas) e comparou a digestão parcial com uso de HCl diluído, que permitiu a determinação de minerais e traços de elementos (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn) em amostras de leite e produtos lácteos. Os resultados obtidos pela técnica de ICP OES, após os diferentes tratamentos de amostra, foram comparados com os obtidos pela técnica de AANI (análise por ativação com nêutrons), que não requer dissolução da amostra. A digestão parcial com HCl diluído para amostras de leite e produtos lácteos mostrou-se adequada para a determinação de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn com boa exatidão e repetibilidade.

Os trabalhos mais recentes são feitos em equipamentos mais modernos, como o ICP - MS, porém, os métodos de extração são os mesmos utilizados em ICP OES. Fabricius et al. (2014) realizaram um estudo com o objetivo de investigar qual o melhor procedimento de preparação de amostras para ICP MS, utilizando suspensões de nanopartículas mais comumente utilizadas (Ag, TiO_2 , CeO_2 , ZnO, Au). Foram testados os métodos de micro-ondas, acidificação da amostra e injeção direta no equipamento. Especificamente para AgNp , utilizou-se a acidificação com HNO_3 (1,4 mL ~ 65%). Em relação à Ag, as amostras acidificadas foram estatisticamente iguais às digeridas em micro-ondas, demonstrando ser melhor que a injeção direta.

Tabela 18 - Leitura da intensidade do sinal (cps) em dois tipos de comprimentos de onda em digestão úmida com HNO₃, HNO₃ + H₂O₂; HNO₃ + HCl na concentração 4,975 ppm.

Amostra	Comprimento	Intensidade (cps)	RSD
Black 1			
	328.068	8838,9	8,23
	338.289	1134,2	24,76
Padrão 1			
	328.068	411483,3	2,05
1 ppm	338.289	244566,8	0,32
Padrão 2			
	328.068	813930,4	2,49
5 ppm	338.289	489193,3	0,06
Padrão 3			
	328.068	2664648,3	1,04
10 ppm	338.289	1589057,3	0,19
Branco 1			
	328.068	-6793,8	0,62
	338.289	-149,9	0,27
Amostra 1			
	328.068	266025,8	9,95
HNO ₃	338.289	140851,8	5,45
Amostra 2			
	328.068	266684,3	6,16
HNO ₃ + H ₂ O ₂	338.289	157463,7	2,98
Amostra 3			
	328.068	2126113,3	1,72
HNO ₃ + HCL	338.289	1205015,6	1,28
Branco 2			
	328.068	-8203,9	0,27
Filtrado	338.289	-16,2	0,05
Amostra 4			
	328.068	74624,5	4,98
HNO ₃ Filtrado	338.289	15942,3	18,04
Amostra 5			
	328.068	81066,5	2,41
HNO ₃ + H ₂ O ₂ Filtrado	338.289	4835,4	1,99
Amostra 6			
	328.068	2019976,5	1,04
HNO ₃ + HCL Filtrado	338.289	1174775	0,8
Amostra reserva			
HNO ₃ + HClO ₄	328.068	88899,1	12,33

Observa-se também nos nossos achados, que a dupla filtragem com filtro de 0,22 μm , não interferiu no resultado.

Outro fato observado refere-se ao comprimento de onda. O melhor resultado de sinal foi observado no comprimento de onda de 328,068 nm, confirmando a recomendação do *Standard Operating Procedure n. 30*, que indica este comprimento de onda para a Ag (ICP OES, 2008).

3.3 Validação da metodologia de análise de prata em leite

3.3.1 Seletividade e especificidade

Os resultados da qualidade do leite utilizado para determinação da seletividade, acurácia e robustez do método e analisado no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG estão descritos na **Tabela 19**.

Tabela 19 - Resultado da análise do leite utilizado na determinação da seletividade, linearidade, acurácia e robustez, realizado no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.

Vaca	CCS (cél x 1.000/mL)	G (g/100g)	P (g/100g)	Lac (g/100g)	EST (g/100g)	ESD (g/100g)	CBT (cél x 1.000/mL)
0215-1	19	3,18	3,03	4,61	11,75	8,57	-

A seletividade e a especificidade do método foram avaliadas pela comparação dos sinais gerados das leituras em concentrações de 49,75 ppb de AgNp; 49,75 ppb de AgNp + AlNp e o branco, de acordo com a **Tabela 20**.

Tabela 20 - Resultado da leitura das amostras de leite fortificadas com 49,75 ppb AgNp; 49,75 ppb AgNp + AlNp e o branco, para avaliação da seletividade e especificidade do método de validação de AgNp em leite.

Amostra	Ag sinal (cps)
LEITE-SEL-BR-1	274,7
LEITE-SEL-BR-2	302,1
LEITE-SEL-BR-3	124,3
LEITE-SEL-BR-4	117,5
LEITE-SEL-BR-5	6,8
LEITE-SEL-BR-6	18,5
LEITE-SEL-Ag-1	28063,0
LEITE-SEL-Ag-2	27058,1
LEITE-SEL-Ag-3	27018,0
LEITE-SEL-Ag-4	25153,2
LEITE-SEL-Ag-5	28220,0
LEITE-SEL-Ag-Al-1	26347,4
LEITE-SEL-Ag-Al-2	25180,1
LEITE-SEL-Ag-Al-3	28465,1
LEITE-SEL-Ag-Al-4	29115,2
LEITE-SEL-Ag-Al-5	27416,9
LEITE-SEL-Ag-Al-6	27092,6

De acordo com a análise de variância e o teste SNK, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as amostras fortificadas com 49,75 ppb de AgNp e com 49,75 ppb de AgNp + AlNp. Porém, como era esperado, houve diferença ($p \leq 0,05$) das amostras fortificadas em relação ao branco (**Tabela 21**).

Tabela 21 - Resultado da análise de variância e do teste SNK comparando a média dos sinais (cps) entre amostras de leite fortificado com 49,75 ppb de AgNp; 49,75 ppb de AgNp + AlNp e branco analisadas em equipamento de ICP OES.

Tratamentos	Médias (cps)
Branco	140.666667 ^b
Ag	27102.400000 ^a
Ag + Al	27269.500000 ^a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste SNK no nível de 95% de significância.

Nossos resultados demonstram que o ICP OES pode ser utilizado para análises multielementares simultâneas, como citado por Dahlquist e Knoll (1978) e Sandroni e Smith (2002). Porém, algumas amostras podem conter elementos incomuns que poderiam contribuir com interferências espectrais (METHOD 6010B, 1996), o que pode, dependendo do elemento, produzir alterações nos sinais. Nossos achados não identificaram outro analito que poderiam alterar a intensidade do sinal nas diferentes amostras.

3.3.2 Linearidade

A linearidade foi calculada em função da leitura da intensidade do sinal de seis diferentes concentrações para formar uma curva (Tabela 22).

O resultado encontrado foi uma reta com coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9964$) (Tabela 23), mostrando uma linearidade alta do método (**Tabela 22**). De acordo com a Anvisa (2017), o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99. Porém, Brasil (2011a) e Brasil (2011b) descrevem que o r^2 mínimo deve ser de 0,995.

Tabela 22 - Leitura dos sinais (cps) de seis pontos utilizados para construção da curva de calibração para o leite realizada em ICP OES.

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal (cps)
1	2,49	11.952
2	2,49	15.042
3	2,49	12.882
Média	2,49	13.292
Desvio padrão	2,49	158,5276001
4	4,98	20.268
5	4,98	21.722
6	4,98	26.920
Média	4,98	22.970
Desvio padrão	4,98	349,7199451
7	9,95	44.292
8	9,95	48.681
9	9,95	48.601
Média	9,95	47.191,333
Desvio padrão	9,95	251,1214912
10	24,88	87.041
11	24,88	100.759
12	24,88	96.120
Média	24,88	94.640
Desvio padrão	24,88	697,7727495
13	49,75	210.227
14	49,75	220.271,500
15	49,75	230.316
Média	49,75	220.271,330
Desvio padrão	49,75	1.004,450
16	99,5	438.379
17	99,5	461.871
18	99,5	453.125
Média	99,5	451.125

Desvio padrão

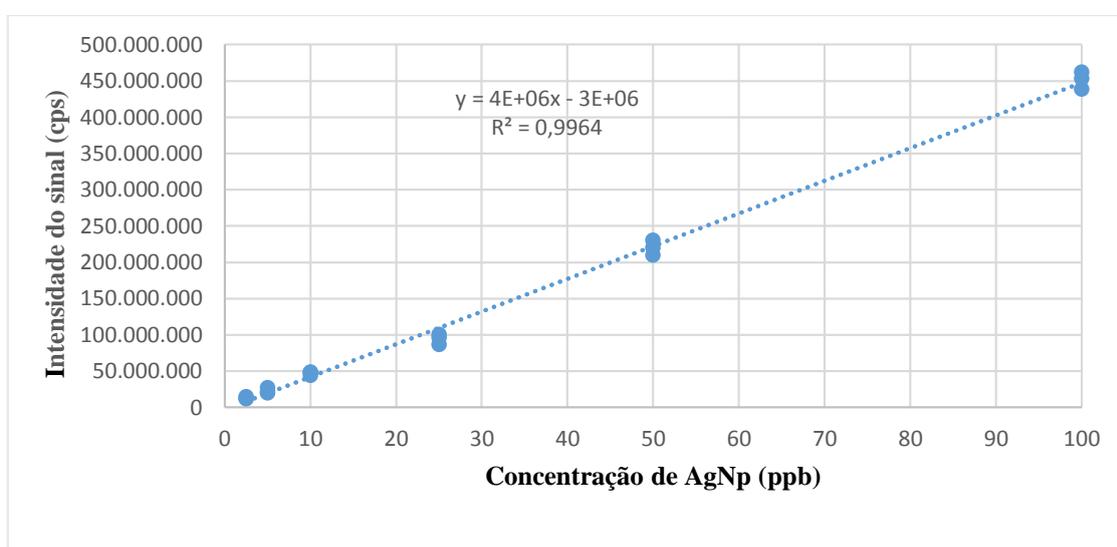
99,5

1.187,3016297

Desvio padrão médio dos seis pontos: 608,1489026

Tabela 23 - Resultado da análise de regressão para Linearidade de amostras de leite fortificadas com diferentes concentrações de AgNp.

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,998216394
R Square	0,99643597
Adjusted R Square	0,996213218
Standard Error	9804753,59
Observations	18

**Figura 22** - Resultado da regressão com uma reta de seis pontos para determinação da Linearidade nas amostras de leite fortificadas com AgNp nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.

Em relação aos resíduos de AgNp o resultado da reta de regressão linear (**Tabela 22**) demonstra uma distribuição normal dos dados. Após a determinação da normalidade dos dados, foi verificada a homocedasticidade de cada nível de concentração pelo teste de Levene (**Tabela 24**) (Almeida et al., 2008; Brasil, 2011b). Outras formas de avaliar a homocedasticidade das variâncias de cada nível de concentração consistem em confeccionar um gráfico de dispersão de resíduos em torno da reta de concentração ou confeccionar outro gráfico com o desvio-padrão das respostas replicadas em cada nível de concentração em função da concentração dos padrões de calibração (Brasil, 2011b).

Tabela 24 - Teste de Levene para verificação da normalidade dos dados de amostras de leite fortificadas com AgNp nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75 e 99,5 ppb.

Test of Homogeneity of Variances			
Intensidade			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,909	5	12	,167

Outro dado observado, refere-se à linearidade dos dados. Mesmo com alguma diferença entre o valor dos sinais em um mesmo ponto, os dados mostram que o desvio padrão foi baixo e que alguma leitura fora do padrão não alterou a linearidade do método, em nenhuma das seis concentrações (**Figura 23**).

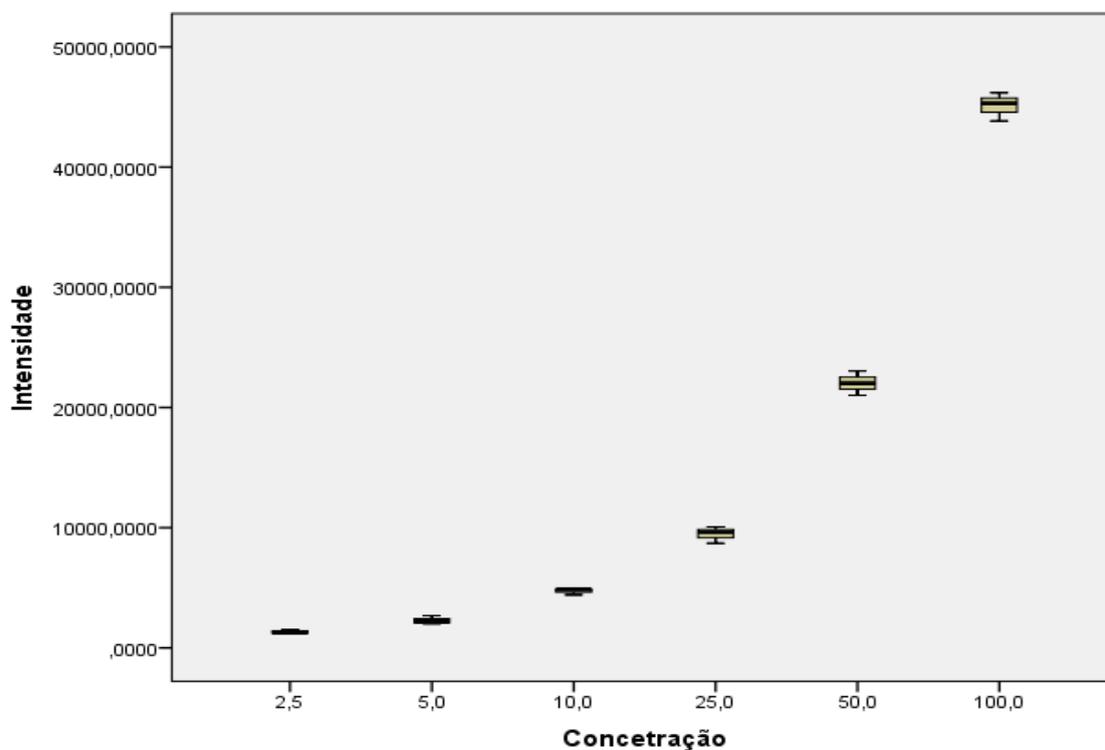


Figura 23 - Gráfico da Linearidade em função do sinal gerado pela leitura em equipamento de ICP OES em amostras de leite fortificadas com AgNp nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75 e 99,5 ppb.

3.3.3 Precisão

De acordo com o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação e Medicamentos Veterinários (Brasil, 2011a) e o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (Brasil, 2011b), o método é considerado preciso se houver um coeficiente de variação de até 30%, utilizando a fórmula do Desvio Padrão Relativo (DPR). Os cálculos

demonstram valores de 4,09; 3,18 e 3,53% para o primeiro dia e de 6,50; 5,80 e 4,67% para o segundo dia, nas concentrações de 4,98; 49,75 e 99,5 ppb, respectivamente (**Tabela 25** e **Tabela 26**), demonstrando que o método utilizado é preciso com resultados até dez vezes abaixo do estabelecido pela legislação.

Tabela 25 - Leitura das concentrações de 4,98; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão, em amostras de leite no primeiro dia de análise.

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal (cps)
1	4,98	2.804,2
2	4,98	2.563,8
3	4,98	2.852,0
4	4,98	2.659,4
5	4,98	2.759,3
6	4,98	2.584,6
7	4,98	2.652,4
MÉDIA	4,98	2.696,529
DP	4,98	110,4351
DPR	4,98	4,0954
1	49,75	28.791,7
2	49,75	27.594,7
3	49,75	28.131,6
4	49,75	28.238,7
5	49,75	28.148,5
6	49,75	27.200,6
7	49,75	26.190,2
MÉDIA	49,75	27.756,57
DP	49,75	855,0848
DPR	49,75	3,1887
1	99,5	56.262,7
2	99,5	55.458,2
3	99,5	56.484,8
4	99,5	57.505,0
5	99,5	56.843,0
6	99,5	55.785,2
7	99,5	56.540,9
MÉDIA	99,5	56.411,4
DP	99,5	1.957,619
DPR	99,5	3,5328

Tabela 26 - Leitura das concentrações de 4,98; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão, em amostras de leite no segundo dia de análise.

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal (cps)
1	4,98	2.534,694
2	4,98	2.444,897
3	4,98	2.712,986
4	4,98	2.314,835
5	4,98	2.551,058
6	4,98	2.471,048
7	4,98	.2805,862
MÉDIA	4,98	2.547,911
DP	4,98	165,7393
DPR	4,98	6,5049
1	49,75	25.160,26
2	49,75	26.038,29
3	49,75	22.337,27
4	49,75	23.841,08
5	49,75	24.657,21
6	49,75	26.699,46
7	49,75	24.422,79
MÉDIA	49,75	24.736,62
DP	49,75	1.437,024
DPR	49,75	5,8092
1	99,5	51.078,94
2	99,5	54.043,98
3	99,5	55.189,67
4	99,5	56.246,88
5	99,5	49.885,31
6	99,5	56.225,1
7	99,5	55.126,47
MÉDIA	99,5	53.970,91
DP	99,5	2.521,344
DPR	99,5	4,6716

3.3.4 Limite de detecção

Limite de detecção é a menor concentração do analito que se consegue detectar, sem quantificar. De acordo com a fórmula descrita na literatura (Brasil, 2011b), o limite de detecção foi de **0,089769 ppb**, conforme cálculo descrito abaixo:

$$LD = 3 \times S$$

$$LD = 3 \times 0,029923$$

$$LD = \mathbf{0,089769 \text{ ppb}}$$

3.3.5 Limite de quantificação

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005). O LQ observado foi de **0,29923 ppb**, conforme cálculo descrito abaixo.

$$LQ = 10 \times S$$

$$LQ = 10 \times 0,029923$$

$$LQ = \mathbf{0,29923 \text{ ppb}}$$

O LQ encontrado está muito próximo ao valor encontrado em nossos ensaios preliminares. Nossos achados quantificaram com precisão mínima, até a concentração de 0,4975 ppb, ou seja, a mais baixa utilizada nos testes preliminares.

3.3.6 Acurácia

Os valores calculados para a verificação da acurácia foram de 100,5542 % na concentração de 2,49 ppb; de 105,3025 % em 49,75 ppb e 92,4668 % na concentração de 99,5 ppb (**Tabela 27**). Estes resultados apresentam valores dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação (Brasil, 2011a; Brasil, 2011b), que indicam concentrações entre $1 \mu\text{g/Kg} \leq C < 10 \mu\text{g/Kg}$ e intervalos entre 70 e 110%. Para concentrações entre $10 \mu\text{g/Kg} \leq C < 100 \mu\text{g/Kg}$, os intervalos situam-se entre 80 a 110%.

Portanto, nossos achados demonstram que em concentrações mais baixas, como a de 2,49 ppb, o equipamento é mais preciso, confirmando nossos resultados demonstrados no item 3.1 e que nos testes preliminares, o melhor sinal ficou entre as concentrações de 39,8 ppb e 3,98 ppb.

Tabela 27 - Recuperação percentual das concentrações de AgNp (ppb) em amostras de leite após leitura em equipamento de ICP OES.

Concentração das amostras fortificadas (ppb)	Leitura	
	Concentração média das amostras recuperadas (ppb)	Recuperação (%)
2,49	2,5038	100,5542
49,75	52,388	105,3025
99,50	92,0045	92,4668

3.3.7 Robustez

A leitura realizada nas 16 amostras para a robustez (**Tabela 28**) foi avaliada pelo Procedimento de *Youden* (**Tabela 29**), demonstrando que os efeitos produzidos pelas mudanças no método não foram efetivos, uma vez que valores seriam significativos apenas acima de 1074,35725 cps (**Tabela 30** e **Tabela 31**). A **Figura 24** demonstra que o maior valor observado foi de 637 (Efeito C) referente ao volume da amostra (9,5 mL (-) / 10,5 mL (+)). Este fato era esperado, pois uma maior variação de volume, altera consequentemente a concentração do analito e o sinal gerado pelo equipamento de ICP OES. Ressalta-se que uma divisão de apenas 0,5 mL, não foi suficiente para alterar o método de forma significativa.

Tabela 28 - Leitura da intensidade do sinal (cps) do leite analisado com diferentes efeitos na metodologia com variações na forma de armazenamento, no tempo de pré-digestão, no tempo de digestão e no volume da amostra.

Amostra	Efeito	Sinal (cps)
1	Leit-Rob-Ref-9,5 mL-pre6-T3 (+---)	28.201,2125
1	Leit-Rob-Ref-9,5-pre6-T3 (+---)	27.833,87866
2	Leit-Rob-Ref-9,5-pre12-T4 (-+--)	26.991,49818
2	Leit-Rob-Ref-9,5-pre12-T4 (-+--)	28.040,42192
3	Leit-Rob-Ref-10,5-pre6-T3 (+++-)	27.204,36769
3	Leit-Rob-Ref-10,5-pre6-T3 (+++-)	26.279,19766
4	Leit-Rob-Ref-10,5-pre12-T4 (-+++)	27.025,23986
4	Leit-Rob-Ref-10,5-pre12-T4 (-+++)	26.251,2369
5	Leit-Rob-Con-9,5-pre6-T4 (----)	26.143,60892
5	Leit-Rob-Con-9,5-pre6-T4 (----)	27.946,82606
6	Leit-Rob-Con-9,5-pre12-T3 (++++)	27.603,35808
6	Leit-Rob-Con-9,5-pre12-T3 (++++)	26.238,09054
7	Leit-Rob-Con-10,5-pre6-T4 (-+++)	27.097,09952
7	Leit-Rob-Con-10,5-pre6-T4 (-+++)	26.072,16888
8	Leit-Rob-Con-10,5-pre12-T3 (++++)	28.108,66715
8	Leit-Rob-Con-10,5-pre12-T3 (++++)	25.864,65659

Tabela 29 - Procedimento de Youden para amostras de leite com variações na forma de armazenamento, no tempo de pré-digestão, no tempo de digestão ácida e no volume da amostra.

Amostra	Efeito				R	Variância	GL
	A	B	C	D			
1	+	+	+	+	26987	2517792	1
2	+	+	-	+	26921	931978	1
3	+	-	+	-	26742	427970	1
4	+	-	-	-	28018	67467	1
5	-	+	+	-	26638	299540	1
6	-	+	-	-	27516	550121	1
7	-	-	+	+	26585	525241	1
8	-	-	-	+	27045	1625796	1

Tabela 30 - Análise dos efeitos gerados pelas variações do método em amostras de leite com variações na forma de armazenamento, no tempo de pré-digestão, no tempo de digestão ácida e no volume da amostra.

	Valores dos efeitos	t x erro (critério)
Efeito A	221	1074,35725
Efeito B	82	1074,35725
Efeito C	637	1074,35725
Efeito D	344	1074,35725

Os diferentes efeitos como alterações na forma de armazenamento, no volume das amostras, nos tempos de pré-digestão e de digestão no bloco digestor não alteraram a eficiência da leitura da intensidade do sinal das amostras de leite. O desvio padrão da precisão intermediária (DPI) foi de 1935,45 cps, e o valor do teste F demonstrou que o F calculado (0,04) foi menor que o F tabelado (3,179117053 cps). Portanto, o método pode ser considerado Robusto, pois nenhuma leitura foi superior ao nível de variação, que é de 1074,35725 cps.

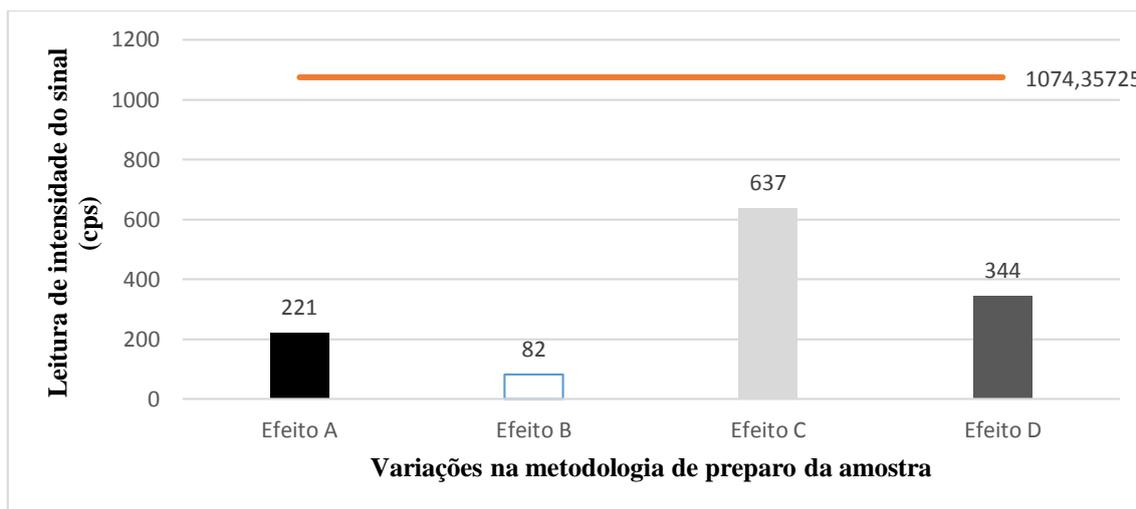


Figura 24 - Respostas da Leitura do ICPOES ao efeito de diferentes metodologias.

3.4 Comparação entre leites com diferentes concentrações de sólidos

Para avaliação da diferença entre amostras de leite com diferentes concentrações de sólidos, as análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG e os resultados estão descritos na Tabela 31.

Tabela 31 - Resultado da análise para comparação entre leites com diferentes concentrações de sólidos realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.

Amostra	CCS (cel x 1.000/mL)	G (g/100 g)	P (g/100 g)	Lac (g/100 g)	EST (g/100 g)	ESD (g/100 g)
A	15	2,76	3,54	4,66	11,89	9,13
B	57	0,20	3,11	3,93	8,05	7,85
C	15	3,61	6,03	7,67	18,89	15,28
D	6	1,73	2,67	3,52	8,63	6,90

Comparando as amostras dos quatro diferentes tipos de leite, nas três concentrações de AgNp avaliadas, apenas nas concentrações de 4,98 ppb e 49,75 ppb de AgNp não foi identificada diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$). Por sua vez, na concentração de 99,5 ppb de AgNp, a amostra de leite desnatado demonstrou intensidade de sinal mais elevado que os demais tratamentos ($p \leq 0,05$). Nossos achados sugerem que durante o processo de digestão ácida, o H livre proveniente do ácido forte ataca tanto as ligações de carbono dos componentes orgânicos da

amostra, quanto outras ligações químicas mais estáveis de outros componentes minerais. Como consequência, a matéria orgânica é degradada e muitos dos compostos orgânicos são ionizados, como é o caso da Ag. No caso do tratamento D, na concentração de 99,5 ppb, possivelmente pela menor quantidade de matéria orgânica, a Ag contida nas AgNp foi melhor ionizada do que nos demais tratamentos, promovendo assim, uma maior intensidade de sinal durante a realização da leitura. Isso se explica porque na espectrometria de emissão atômica, a presença do analito na forma de átomos ou íons é um fator preponderante na emissão de radiações com comprimento de onda nas regiões do UV-Vis, ou seja, interfere diretamente no sinal de leitura do ICP-OES.

De acordo com os resultados obtidos, a metodologia proposta neste trabalho, mostrou-se eficiente e reproduzível para analisar diferentes matrizes de leite contendo Ag nas concentrações que variam de 4,98 a 49,75 ppb. A diferença superior a 5% de significância encontrada em 99,5 ppb não afeta a eficácia do método. O padrão legal estipulado pela Resolução RDC nº 17 de 17 de março de 2008 é 0,05 mg/kg (Anvisa, 2008), ou seja 50 ppb.

3.5 Verificação da presença de Ag em amostras de leite acondicionadas em embalagens de polietileno acrescentados de AgNp

O leite utilizado para construção de uma curva de leitura do leite foi coletado em São Paulo e analisado no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG. Os resultados estão expressos na **Tabela 32**.

Para a leitura das amostras de leite obtidas de embalagens de polietileno com AgNp comercializadas em supermercados do estado de São Paulo, fez-se primeiramente uma curva com cinco pontos das amostras de leite fortificadas com AgNp. Com o resultado da curva ($r^2 = 0,9999$) (**Figura 25**), fez-se o alinhamento do equipamento de ICP OES para leitura das amostras comerciais.

Tabela 32 - Resultado da análise do leite utilizado na construção da curva para leitura das amostras de leite coletadas em São Paulo, realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora - MG.

Vaca	CCS (cél x1.000/mL)	G (g/100g)	P (g/100g)	Lac (g/100g)	EST (g/100g)	ESD (g/100g)	CBT (cél x1.000/mL)
0142	57	1,01	3,03	4,87	9,84	8,83	--

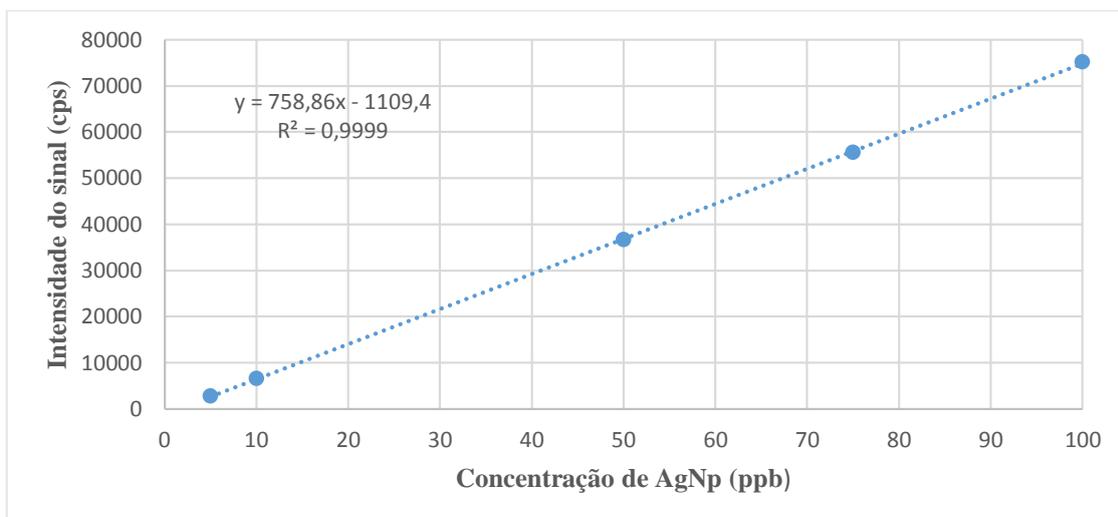


Figura 25 - Curva utilizada para leitura do leite envasado em garrafas de polietileno acrescentadas com AgNp, comercializado no estado de São Paulo.

Após as análises das amostras de leite coletadas em supermercados do Estado de São Paulo, verificou-se presença de Ag no leite e nas embalagens, conforme **Tabela 33**, **Tabela 34** e **Tabela 35**.

Tabela 33 - Detecção de Ag (ppb) analisadas por ICP OES em amostras de leite integral embalado em garrafas de polietileno com AgNp comercializadas no Estado de São Paulo.

Amostra	Resultado (ppb)
1 A	2,147
1 B	3,796
1 C	1,585
1 D	3,150
2 A	0,934
2 B	5,130
2 C	1,973
2 D	1,689
3 A	1,149
3 B	1,035
3 C	1,397
3 D	2,004

Leite 1: Lote: 201612 / Validade: 27/09/16

Leite 2: Lote: 201615 / Validade: 30/09/16

Leite 3: Lote: 201616 / Validade: 01/10/16

Tabela 34 - Resultados da concentração de AgNp encontrada em análise por ICP OES em amostras de leite desnatado embalado em garrafas de polietileno com AgNp comercializadas no Estado de São Paulo.

Amostra	Resultado (ppb)
1 A	0,566
1 B	1,096
1 C	3,780
1 D	1,597
2 A	1,449
2 B	0,566
2 C	1,780
2 D	0,916
3 A	2,555
3 B	1,267
3 C	0,702
3 D	0,688

Todas as amostras: Lote: 201615 / Validade: 30/09/16.

Tabela 35 - Resultados da concentração de AgNp encontrada em análise por ICP OES em garrafas de polietileno com AgNp comercializadas no Estado de São Paulo.

Amostra	Resultado (ppb)
Desnatado 1	$27,75 \times 10 = 277,5$
Desnatado 2	$27,51 \times 10 = 275,1$
Desnatado 3	$36,62 \times 10 = 366,2$
Integral 1	$35,46 \times 10 = 354,6$
Integral 2	$12,40 \times 10 = 124$
Integral 3	$32,81 \times 10 = 328,1$

Após a leitura das amostras no ICP OES, verificou-se que a maior concentração de Ag no leite embalado em garrafas de polietileno com AgNp foi de 5,13 ppb nas amostras de leite integral. Porém, os valores encontrados estão dentro dos parâmetros legais estipulados pela Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008, que é 0,05 mg/kg (Anvisa, 2008). Transformando de ppb para mg/Kg, o maior resultado foi de 0,00513 mg/Kg, ou seja, dez vezes menor que a exigência legal. Porém, a maioria das amostras, tanto do leite integral, quanto do leite desnatado ficaram entre 1 e 2 ppb.

Este resultado demonstra que o uso das embalagens de polietileno com AgNp são seguras e garantem maior qualidade ao produto armazenado, conservando os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e o *shelf-life*.

Alguns estudos foram realizados em diversos países e os dados são contraditórios. Von Goetz et al. (2013), Cushen et al. (2014) e Ntim et al. (2015) relataram a presença de migração de AgNp das embalagens para os alimentos. Outros autores (Bott et al., 2014; Jokar e Abdul Rahman, 2014; Artiga et al., 2015), no entanto, não detectaram vestígios de migração das AgNp das embalagens para o leite.

Ntim et al. (2015) demonstraram que concentrações muito pequenas de prata migram sob a forma de prata iônica (Ag^+). No entanto, Becaro et al. (2015) avaliaram o uso de filmes plásticos com AgNp em embalagens de vegetais e não observaram migração para o alimento. Da mesma forma, Li et al. (2017) não observaram migração de prata em embalagens revestidas com AgNp em arroz, sendo que a embalagem com AgNp melhorou a qualidade microbiológica e físico-química do

alimento. Portanto, os resultados de vários estudos com AgNp não são conclusivos. Quase todos os estudos são congruentes e descrevem que a migração é mais alta em meio ácido, mas os achados são bastante contraditórios (Stormer et al., 2017).

Em relação às embalagens de polietileno com AgNp, uma amostra de leite desnatado apresentou concentração acima de 360 ppb, resultado 100 vezes maior que o encontrado no leite. Contudo, altas concentrações de prata na mistura de polímeros com as AgNp são esperadas. Os resultados sugerem que não houve migração significativa das embalagens para o leite, confirmando os achados de Bott et al. (2014), Jokar e Abdul Rahman (2014) e Artiga et al. (2015), que não detectaram vestígios de migração das AgNp para os alimentos.

Provavelmente, a Ag detectada no leite não é especificamente resultado da migração de prata das garrafas de polietileno para o leite e sim devido a passagem do leite pelas AgNp e ao contato com a superfície.

4 Conclusão

O equipamento de ICP OES é preciso e eficiente na detecção e leitura de AgNp em leite, principalmente em concentrações entre 3,98 e 39,8 ppb.

Em relação ao método de digestão, o uso do HNO₃ na pré-digestão, associado ao HCl durante o aquecimento, gera ótimo sinal, com um desvio padrão menor do que 2%.

A melhor configuração do equipamento para leitura de AgNp em leite é a de 328.068 nm, confirmando a recomendação do fabricante.

Quanto ao processo de validação, o método se mostrou bastante seletivo, pois não houve diferença entre as amostras com AgNp e AgNp + AlNp. Em relação à linearidade e à precisão, os valores estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Os valores de LD (0,089769 ppb) e LQ (0,29923 ppb) demonstram que os cálculos teóricos se aproximam dos valores observados durante os testes de determinação da sensibilidade de 0,4975 ppb, confirmados pela leitura das amostras de leite coletadas no Estado de São Paulo, sendo o menor valor de 0,566 ppb.

Para a acurácia, o método obteve boa recuperação, demonstrando que em concentrações mais baixas como a de 2,49 ppb o equipamento é mais preciso. O método pode ser considerado robusto dentro das condições avaliadas pelo método de *Youden*.

Avaliando fatores referentes a grandes alterações nos níveis de sólidos do leite, basicamente gordura e proteína, o método demonstra que amostras de leite com menores teores de sólidos geram um sinal mais intenso em concentrações de 99,5 ppb, confirmando que o método é mais eficaz e linear para o leite em concentrações entre 4,98 e 49,75 ppb.

Quanto à determinação de AgNp em embalagens de polietileno, o leite analisado não demonstrou presença significativa de prata, sugerindo não haver migração significativa de Ag da embalagem de polietileno com AgNp para o leite.

Portanto, o método de digestão proposto e as análises em equipamento de ICP OES constituem ótima opção para determinação de AgNp em amostras de leite.

5 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A.; ELIAN, S.; NOBRE, J. Modificações e alternativas aos testes de Levene e de Brawn e Forsythe para igual de variâncias e médias. **Revista Colombiana de Estatística**, v. 31, n. 2, p. 241-260, 2008.

AMARO-LÓPEZ, M.A.; MORENO-ROJAS, R.; SANCHEZ-SEGARRA, P.J.; ZURERACOSANO, G. Tratamiento de las matrices lácteas para la determinación de trazas metálicas por absorción atómica. **Alimentaria**, p. 71-78, 1996.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em 28 de janeiro de 2018.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008. **Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Lista Positiva de Aditivos para Materiais Plásticos destinados à Elaboração de Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos**.

ARTIAGA, G., RAMOS, K., RAMOS, L., C. AMARA, C., GOMEZ-GOMEZ, M. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS. **Food Chemistry**, v.166, p.76-85, 2015.

BOTT, J., STORMER, A., FRANZ, R. Migration of nanoparticles from plastic packaging materials containing carbon black into foodstuffs. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v.31, p.1769-1782, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Acesso em 14 de setembro de 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2011a. 72 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 14 de Agosto de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011b. 227 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 16 de Agosto de 2016.

CONAB- CAMPANIA BRASILEIRA DE ABASTECIMENTO - **Conjuntura mensal especial leite e derivados, 2017**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_15_14_13_38_leite_abril_2017.pdf. Acesso em: 17 de outubro de 2017.

CUSHEN, M., KERRY, J., MORRIS, M., CRUZ-ROMERO, M., CUMMINS, E. Evaluation and simulation of silver and copper nanoparticle migration from polyethylene nanocomposites to food

and an associated exposure assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.1403-1411, 2014.

DAHLQUIST, R.L.; KNOLL, J.W. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Analysis of biological materials and soils for major, trace, and ultra-trace elements. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 32, p. 1-29, 1978.

DEHKORDI, S. H; HOSSEINPOUR, F.; KAHRIZANGI, A. E. An *in vitro* evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.52, p. 10795-10797, 2011.

ERNST, T. R.; POPP, R.; VAN ELDIK, R. **Talanta**, v.53, n.2, 2000. p.347-357.

FABRICIUS, A. L.; DUESTER, L.; MEERMANN, B.; TERNES, T. A. ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles—sample preparation and off-line fractionation strategies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, p.467-479, 2014.

FAPESP. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. **Empresa paulista dobra prazo de validade de leite fresco pasteurizado**, 2015. Disponível em: http://agencia.fapesp.br/empresa_paulista_dobra_prazo_de_validade_de_leite_fresco_pasteurizado/21325/. Acesso em: 15 de outubro de 2017.

HOENING, M.; KERSABIEC, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochim Acta, Part B**, v. 51, p. 1297-1307, 1996.

ICH. **Guidance for Industry. Q2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996. Acesso em 27 de Julho de 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>

ICH: **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1)**. ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

ICP – OES Analyses. 30V8. **Standard Operating Procedure n. 30**. Questa Rock Pile Stability Study. Editorial SKA, 2008. Acesso em 28 de Agosto de 2015. Disponível em: https://geoinfo.nmt.edu/.../SOP_30v8_ICP_OES_fin.

IDF. International IDF Standard 148A:1995: **Milk – Enumeration of somatic cell**. Brussels, 1995, 8 f.

IDF. International IDF Standard 141C:2000: **Whole milk – determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments**. Brussels, 2000, 15 f.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDÚSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ – CGCRE – 008), Revisão 05**, 2016.

JOKAR, M.; ABDUL RAHMAN, R. Study of silver ion migration from meltblended and layered-deposited silver polyethylene nanocomposite into food simulants and apple juice. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.31, p.734-742, 2014.

KHAN, N.; JEONG, I. S.; HWANG, I. M.; KIM, J. S.; CHOI, S. H.; NHO, E. Y.; CHOI, J. Y.; KWAK, B. M.; AHN, J. B.; YOON, T.; KIM, K. S. Method validation for simultaneous determination of chromium, molybdenum and selenium in infant formulas by ICP-OES and ICP-MS. **Food Chemistry**, v.141, p.3566–3570, 2013.

KIRA, C. S. **Estudo da composição mineral e dos elementos-traço essenciais em amostras de leite e produtos lácteos por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido e análise por ativação com nêutrons**. 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LI, L.; ZHAO, C.; ZHANG, Y.; YAO, J.; YANG, W.; HU, O. WANG, C.; CAO, C. Effect of stable antimicrobial nano-silver packaging on inhibiting mildew and in storage of rice. **Food Chemistry**, v.215, p.477–482, 2017.

METHOD 6010B. INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY. **CD- ROM, Revision 2**, 1996.

MUDALIGE, T. K.; LINDER, S. W. **Development of Screening Methodologies for the Detection of Nanoscale Silver in FDA Regulated Food Products Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)**, 2013.

NAOZUKA, J.; VEIGA, A. M. S.; OLIVEIRA, P. V.; OLIVEIRA, E. Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.18, p.917–921, 2003.

NTIM, A.S.; THOMAS, T. A.; BEGLEY, T. H.; NOONAN, G. O. Characterization and potential migration of silver nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials. **Food Additives & Contaminants: A**, v.32, n.6, p.1003-1011, 2015.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002.

SANDRONI, V.; SMITH, C.M.M. Microwave digestion of sludge, soil and sediment samples for metal analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.468, p. 335-344, 2002.

SANTANA, S. V. **Nanopartículas de prata e Ag/Zn⁰ nanoestruturado como agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de micro-ondas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de mestre em Química, 2012.

SKURIKHIN, I. M. Methods of analysis for toxic elements in foods. Part IV. General method of ashing for the determination of toxic elements. **Journal Association of Official Analytical Chemists International**, v.76, n.2, p. 257-262, 1993.

SOUZA, R.; SANTOS, G. T.; VALLOTO, A. A.; SANTOS, A. L.; GASPARINO, E.; SILVA, D. C.; SANTOS, W. B. R. Produção e qualidade do leite de vacas da raça Holandesa em função

da estação do ano e ordem de parto. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.2, p. 484-495, 2010.

STANGA, M. **Sanitation – Cleaning and Disinfection in the Food Industry**. Wiley – VCH, Weinheim, 2010.

STORMER, A.; BOTT, J.; KEMMER, D.; FRANZ, R. Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics. **Trends in Food Science & Technology**, v.63, p.39-50. 2017.

Capítulo 3: Validação de metodologia para análise de prata em músculo, rim e fígado bovino por Espectrometria de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)

1 Introdução

Nos últimos anos, o Brasil vem se consolidando como um dos maiores produtores de alimentos do mundo. As condições climáticas, a produção de grãos e a grande extensão territorial fizeram do país, a partir de 2008, o maior exportador de carnes do mundo (Brasil, 2016).

As excelentes condições de produção favorecem o país e o tornam altamente competitivo, conseguindo produzir com baixo custo e boa qualidade. Porém, o Brasil enfrenta várias barreiras sanitárias devido aos questionamentos em relação às medidas sanitárias adotadas na cadeia produtiva. Entre estas, destaca-se a presença de resíduos de medicamentos nos produtos “*in natura*” e processados.

É muito pertinente a preocupação em relação a presença de resíduos nos alimentos, pois o uso de substâncias químicas como os antimicrobianos no processo produtivo, principalmente em animais confinados, vem crescendo e há uma pressão mundial para diminuição do uso de medicamentos em animais de produção.

Devido a estes fatores, o uso dos antimicrobianos tradicionais está sendo muito questionado, e novas tecnologias são necessárias para produção de acordo com as normas estabelecidas pelo mercado mundial. Neste sentido, há um avanço e crescimento dos compostos nanoparticulados como AgNp. Estes novos produtos serão utilizados em animais de produção em um futuro próximo, acarretando novos riscos em relação a presença de resíduos na carne ou em seus derivados.

Alguns trabalhos sugerem que o uso de Np diminui o risco da presença de resíduos, pois são de melhor absorção e metabolização, possuem menor degradação, são rapidamente capturados por células do sistema mononuclear fagocitário e podem ser administradas por várias vias, com aumento da seletividade pelo local de ação (Vila et al., 2002). Porém, não há dados confirmatórios sobre a menor possibilidade da presença de resíduos em animais tratados com o uso das Np.

Estudos demonstram que há um risco de acúmulo de Np em animais tratados. De forma geral, as AgNp podem ser absorvidas pelos animais e se acumular em alguns órgãos como fígado e rim (Gaillet e Rouanet, 2015) ou na musculatura (Park et al., 2011), podendo inclusive serem excretadas nas fezes e urina (Nefzger et al., 1984), levando à poluição e ao acúmulo destes materiais no meio ambiente.

Portanto, tornam-se necessários o desenvolvimento e validação de técnicas analíticas para detecção de resíduos destes novos compostos em alimentos como produtos cárneos e derivados. A espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) é uma alternativa eficiente para detecção de metais em diversas matrizes biológicas (Dahlquist e Knoll, 1978; Sandroni e Smith, 2002).

O objetivo deste capítulo é determinar e validar uma metodologia para detecção de Ag em tecidos de bovinos (músculo, rim e fígado) usando o ICP OES, seguindo as normas estabelecidas pelos

órgãos reguladores nacionais (Brasil, 2011a; Brasil, 2011b; INMETRO, 2016; Anvisa, 2003) e internacionais (ICH, 1996).

2 Material e Métodos

Foram adquiridos diretamente de um frigorífico sob inspeção municipal na cidade de Bambuí – MG, 2 kg de contra-filé (*Longissimus dorsi*), um fígado inteiro e dois pares de rins, sendo todos de duas novilhas selecionadas e indicadas pelo criador, criadas em confinamento e isentas de qualquer uso de antimicrobianos ou outras substâncias nos 60 dias pré abate. Após a coleta, as peças foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e transportadas até o Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG. No laboratório, cada peça foi limpa com a retirada de todo tecido adiposo e processada em equipamento Tecnal TE – 102 99Turratec (Piracicaba, SP, Brasil), com uma rotação de 14.000 g, dentro de um tubo Falcon de 50 mL. O material processado foi acondicionado em um Bécker de 1000 mL e mantido sob refrigeração durante o preparo das amostras. Após homogeneização, uma alíquota de 100 g de cada uma das matrizes, foi coletada em duplicata e encaminhada para o Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG para análise de composição (teores de gordura e proteína).

2.1 Seletividade e especificidade

Após a amostra ser moída, pesaram-se 10 mg de AgNp pura Sigma-Aldrich (cat. n° 576832) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de 100 nm, em balança de precisão Shimadzu Modelo AUW 220 D (Maryland 21046, U.S.A.) que foi dispensada em um tubo Falcon de 50 mL com 30 mL de água deionizada por osmose reversa e sonicada por uma hora em equipamento (Hielscher UP 200 S (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha), potência 300 W, ciclo de 0,5 e amplitude de 70%) em banho de gelo. Após serem sonicadas, o tubo Falcon com as AgNp foi vertido em um balão de 100 mL. Acrescentaram-se 70 mL de água deionizada por osmose reversa, formando uma suspensão Stock de 100.000 ppb, corrigida para 99.500 ppb. Em seguida, pipetou-se 0,5 mL da suspensão Stock 1 de 99.500 ppb e dispersou-se um segundo balão de 100 mL com água deionizada por osmose reversa, formando uma suspensão Stock 2 de 497,5 ppb de AgNp.

Para a avaliação da seletividade, fez-se outra suspensão de 10 mg de AgNp com 10 mg de nanopartículas de óxido de alumínio (AlNp) (< 50 nm) Sigma-Aldrich (cat. n° 544833) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), seguindo os mesmos procedimentos anteriores para a obtenção de uma suspensão Stock de 497,5 ppb de AgNp + AlNp.

Para preparo das amostras com Ag e Al, pipetou-se 1 mL da suspensão Stock de 497,5 ppb Ag + Al e dispensou-se em um tubo digestor de 75 mL, juntamente com 9 g de amostra da matriz, com seis repetições. Uma amostra com a concentração de Ag + Al de 49,75 ppb foi preparada e homogeneizada com uso de um bastão de vidro.

Para o preparo das amostras apenas com Ag, pipetou-se 1 mL da suspensão Stock de 497,5 ppb apenas com Ag e dispensou-se da mesma forma em seis tubos digestores de 75 mL com 9 g de amostra. Homogeneizou-se com um bastão de vidro e foi obtida uma amostra com 49,75 ppb de

Ag. Para o branco, pesaram-se 10 gramas de amostra em seis tubos digestores de 75 mL. No total, prepararam-se 18 amostras de 10 g, sendo seis com AgNp + AlNp; seis apenas com AgNp e seis com o branco.

Em seguida, as amostras foram encaminhadas para a estufa a 105° C por 24 h, e após a secagem, foram adicionados 5 mL de HNO₃ em cada tubo para fazer uma pré-digestão por 12 h.

Após a pré-digestão, as amostras foram encaminhadas para o bloco digestor a uma temperatura de 90° C por um período de 45 min, e aumentada para 110°C por um período de mais 45 min. Em seguida, a temperatura foi elevada até atingir 150°C por mais 30 min. Adicionou-se 1 mL de HCl e foi feito mais aquecimento a 150 ° C por 30 min. Em seguida, colocou-se mais 1 mL de HCl e foi feito mais aquecimento a 150 ° C por 30 min, totalizando 3:30 h de digestão.

Retiraram-se as amostras do bloco digestor e, após o resfriamento, ressuspendeu-se com água deionizada por osmose reversa para completar 10 g. Fez-se a filtração em papel filtro Qualitativo 28 µm em funil de vidro de 50 mm. Os frascos Pleion de 40 mL foram então armazenados.

Encaminharam-se as amostras para leitura no ICP – OES Optima™ 8300, (PerkinElmer, Inc. 940 Winter Street Waltham, MA 02451, USA) na configuração de 1.400 W de potência, vazão do gás auxiliar de 0,2 l/min e nebulização do plasma de 0,8 L/min, modo Axial e comprimento de onda de 328,068 nm.

Os resultados foram comparados após serem submetidos à análise de variância. O teste SNK (Student-Newman-Keuls) foi utilizado para comparação das médias pelo programa estatístico Sisvar 5.6, de acordo com Ferreira (2011).

2.2 Linearidade

Para determinação da linearidade foram usadas as mesmas amostras descritas anteriormente. Utilizou-se a suspensão Stock de 99.500 ppb de AgNp, da qual retirou-se 0,5 mL que foi dispensado em um balão de 100 mL de água deionizada por osmose reversa, fazendo uma suspensão Stock 02 (497,5 ppb).

A partir da suspensão Stock 02, prepararam-se seis amostras de cada um dos sete pontos da construção da curva, e três amostras com o branco:

- 1° Ponto: 2,49 ppb → 0,05 mL suspensão Stock 497,5 ppb em 9,95 g de amostra
- 2° Ponto: 4,98 ppb → 0,1 mL suspensão Stock 497,5 ppb em 9,9 g de amostra
- 3° Ponto: 9,95 ppb → 0,2 mL suspensão Stock 497,5 ppb em 9,8 g de amostra
- 4° Ponto: 24,88 ppb → 0,5 mL suspensão Stock 497,5 ppb em 9,5 g de amostra
- 5° Ponto: 49,75 ppb → 1,0 mL suspensão Stock 497,5 ppb em 9,0 g de amostra
- 6° Ponto: 74,63 ppb → 1,5 mL suspensão Stock 497,5 ppb em 8,5 g de amostra
- 7° Ponto: 99,5 ppb → 2,0 mL suspensão Stock 497,5 ppb em 8,0 g de amostra
- Branco: 10 g de amostra

Após a mistura da amostra com a suspensão Stock, as mesmas foram homogeneizadas com o uso de um bastão de vidro, formando 45 amostras de 10 g em tubos digestores de 75 mL e colocados em estufa para secagem por 24 h. Em seguida, foram digeridos e acondicionados para posterior leitura em equipamento de ICP OES, seguindo a mesma metodologia citada anteriormente.

Para a construção da curva de calibração, as leituras de intensidade do sinal foram transcritas para o programa de estatística SPSS, para realização de regressão linear, análise de variância e teste de homocedasticidade pelo teste de Levene.

2.3 Precisão

Para determinar a precisão do método, duas leituras foram realizadas com intervalo de um dia, em 18 amostras, divididas em três grupos (9,95; 49,75 e 99,5 ppb) com seis amostras em cada grupo, com utilização das matrizes citadas anteriormente. As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 2.1 deste capítulo.

Após a leitura em equipamento de ICP OES, fez-se um cálculo matemático pelo desvio padrão relativo (DPR) (INMETRO, 2016; Anvisa, 2017):

$$\text{DPR} = \text{DP} / \text{CMD} \times 100$$

2.4 Limite de detecção

Limite de detecção é o teor mínimo a partir do qual é possível deduzir a presença do analito com certeza analítica razoável (95% de confiança) (Brasil, 2011b). Para tal, fez-se análise de 24 replicatas da matriz branca. Os valores foram utilizados para o cálculo, seguindo a fórmula descrita em Brasil (2011b):

$$\text{LD} = 3 \times s$$

Sendo:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca (n > 20).

2.5 Limite de quantificação

Teor mínimo medido a partir do qual é possível medir o analito com certeza estatística razoável (95% de confiança). Se a veracidade e a precisão são constantes em uma gama de concentrações centrada no limite de detecção, o limite de quantificação é numericamente igual a seis ou dez vezes o desvio-padrão da média de ensaios em branco (n > 20) (Brasil, 2011b). Utilizaram-se os resultados obtidos no ensaio de LD e o cálculo foi feito usando a fórmula:

$$\text{LQ} = 10 \times s$$

Sendo:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca (n > 20).

2.6 Acurácia

A leitura para determinação da acurácia foi realizada utilizando-se amostras com três concentrações diferentes, sendo seis amostras de 9,95 ppb; seis amostras de 49,75 ppb e seis amostras de 99,5 ppb. O preparo das amostras seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente no item 2.1 deste capítulo, com a composição das matrizes analisadas como descrito anteriormente. O cálculo foi realizado de acordo com a fórmula sugerida por Brasil (2011a).

$$\text{Frec} = \text{Cf} - \text{Cnf} / \text{Cad} \times 100$$

Sendo:

Cf = concentração medida após fortificação da matriz branca;

Cnf = concentração medida na matriz branca não fortificada, i.e., antes da fortificação;

Cad = concentração do analito puro adicionado à matriz branca.

2.7 Robustez

Na avaliação da robustez, fez-se o preparo das amostras seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente no item 2.1, deste capítulo.

As amostras para robustez no músculo foram preparadas na concentração de 49,75 ppb, acondicionadas em tubos digestores de 75 mL e divididas em dois grupos. O primeiro grupo contendo 12 amostras foi digerido em bloco digestor chamado de Bloco 01 e, o segundo grupo, em bloco digestor chamado de Bloco 02. Em seguida, cada um dos dois grupos foi dividido em grupo com pré-digestão de 6 h (seis amostras) e grupo com pré-digestão de 12 h (seis amostras) em HNO₃. Cada um dos grupos de pré-digestão foi novamente dividido entre amostras congeladas a - 18°C por 24 h (três amostras), e outro grupo (três amostras) refrigerado por 24 h a 6°C, conforme **Figura 26**.

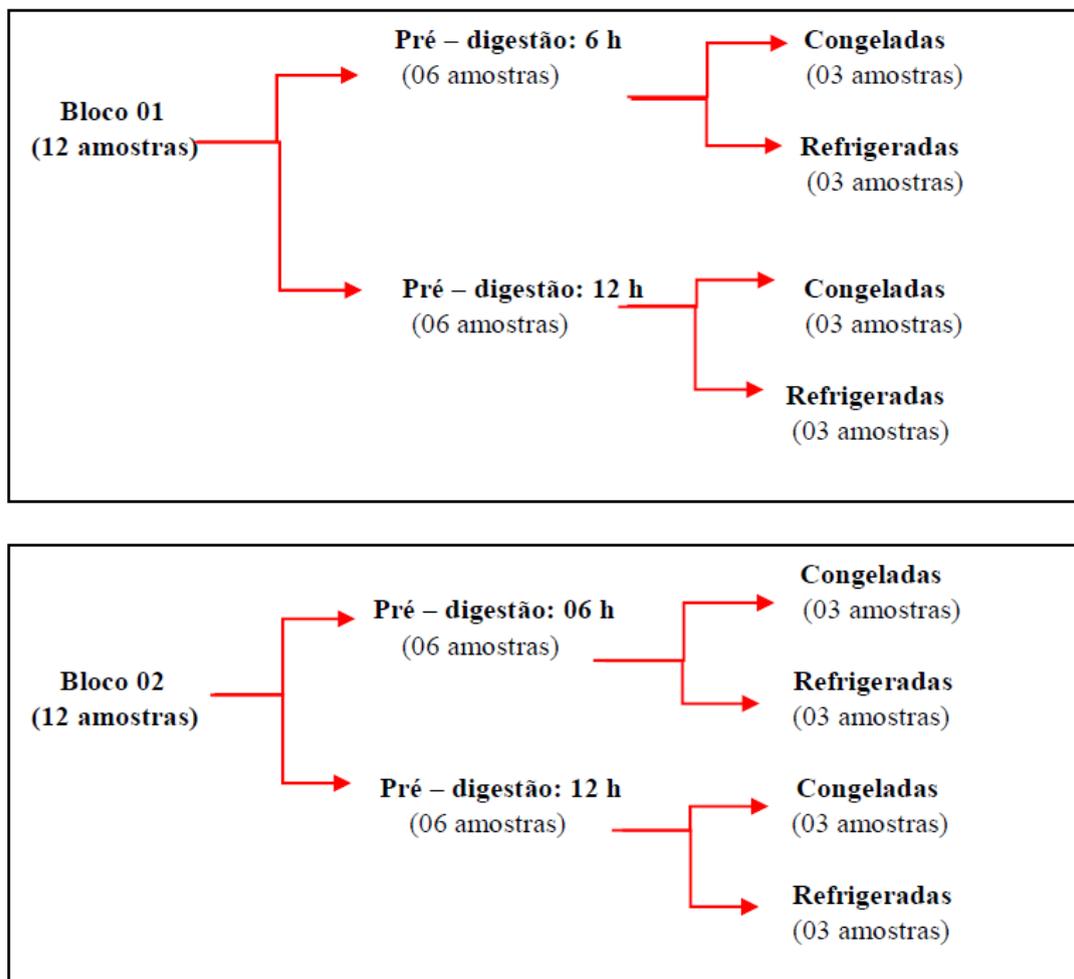


Figura 26 - Fluxograma da distribuição das amostras de músculo bovino para robustez.

Para a avaliação da robustez no rim e no fígado, prepararam-se 36 amostras de cada uma das duas matrizes nas concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb, que foram acondicionadas em tubos digestores de 75 mL. As amostras de cada uma das duas matrizes foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo (18 amostras) foi congelado a -18°C por 24 h e o segundo grupo (18 amostras), foi refrigerado por 24 h a 6°C . Em seguida, cada um dos dois grupos foi dividido em grupo com pré-digestão em HNO_3 de 6 h (nove amostras) e grupo com pré-digestão de 12 h (nove amostras), conforme **Figura 27**.

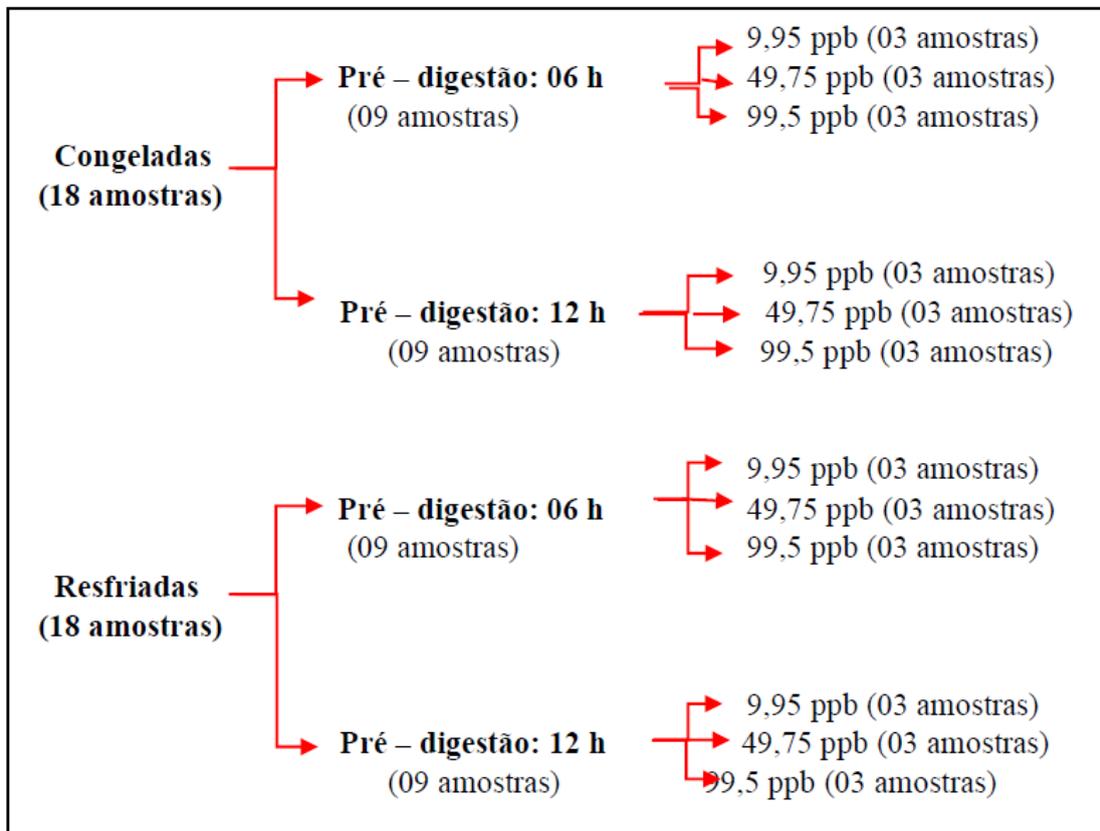


Figura 27 - Fluxograma da distribuição das amostras de rim e fígado bovino para robustez.

Os procedimentos de secagem, digestão, armazenamento e leitura em equipamento de ICP OES foram realizados de acordo com a metodologia citada anteriormente no item 2.1, deste capítulo, com adaptações no processo de pré-digestão (6h/12h).

Os resultados de cada uma das matrizes foram comparados após serem submetidos à análise de variância e ao teste SNK (Student-Newman-Keuls) para comparação de médias, utilizando programa estatístico Sisvar 5.6, segundo Ferreira (2011).

3 Resultados

Os resultados das análises no Laboratório de Análises de Alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG estão descritos na **Tabela 36**.

Tabela 36 - Composição de sólidos das amostras de músculo, rim e fígado bovino, realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG,

Amostra	Matéria seca (MS%)	Proteína (PB%)	Gordura (EE%)
Músculo	30,955	23,085	22,36
Rim	17,88	82,215	10,315
Fígado	29,45	69,32	4,635

3.1 Seletividade e especificidade

A seletividade e especificidade do método foram avaliadas pela comparação dos sinais gerados em equipamento de ICP OES, nas concentrações de 49,75 ppb de AgNp; 49,75 ppb de AgNp + 49,75 ppb de AlNp e branco, de acordo com a **Tabela 37**.

Tabela 37 - Resultado da leitura das amostras de músculo bovino, rim e fígado bovino fortificadas com 49,75 ppb de AgNp e 49,75 ppb de AgNp + AlNp para avaliação da seletividade e especificidade do método de digestão ácida e análise em ICP OES

Amostra	Sinal (cps) Músculo bovino	Sinal (cps) Rim bovino	Sinal (cps) Fígadoim bovino
AgNp	23663,7	24510,5	24831,9
AgNp	24022,8	24596,4	22651,4
AgNp	24556,6	21459,5	23757,1
AgNp	22560,6	23542,8	24703,9
AgNp	23492,2	24340,1	24581,5
AgNp	23580,7	25298,2	26016,9
AgNp + AlNp	24170,0	24431,6	23449,0
AgNp + AlNp	21852,1	22964,4	25621,9
AgNp + AlNp	23793,0	23515,7	23966,1
AgNp + AlNp	24683,0	24853,5	26512,4
AgNp + AlNp	24701,1	22275,0	23600,0
AgNp + AlNp	22688,7	24572,7	23894,4
Branco	-133,6	36,0	73,9
Branco	-109,4	-123,5	-53,5
Branco	-115,9	-129,5	-22,6
Branco	-116,9	-106,5	-41,1
Branco	-60,4	-58,4	2,8
Branco	-94,4	-23,7	-33,2

Observou-se que em todas as três matrizes avaliadas, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as amostras com AgNp e as amostras com AgNp + AlNp (**Tabela 38**, **Tabela 39** e **Tabela 40**). Em relação ao branco, ou seja, amostras não fortificadas, houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação às fortificadas, fato esperado, pois nestas amostras não havia analito para gerar sinal e leitura no equipamento de ICP OES.

Tabela 38 - Média dos sinais (cps) entre amostras de músculo bovino tratado com AgNp e AgNp + AlNp

Tratamentos	Médias (cps)
Branco	-105.000000 ^b
Ag	23646.333333 ^a
Ag + Al	23648.000000 ^a

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste SNK no nível de 95% de significância.

Tabela 39 - Média dos sinais (cps) entre amostras de rim bovino tratado com AgNp e AgNp + AlNp

Tratamentos	Médias (cps)
Branco	-67.833333 ^b
Ag	23958.000000 ^a
Ag + Al	23769.000000 ^a

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste SNK no nível de 95% de significância.

Tabela 40 - Média dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino tratado com AgNp e AgNp + AlNp

Tratamentos	Médias (cps)
Branco	-12.166667 ^b
Ag	24423.833333 ^a
Ag + Al	24507.166667 ^a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste SNK no nível de 95% de significância.

3.2 Linearidade

A linearidade foi calculada pela leitura da intensidade do sinal de sete pontos, de diferentes concentrações, formando uma curva para cada uma das três matrizes analisadas (**Tabela 41**, **Tabela 42** e **Tabela 43**).

Tabela 41 - Leitura da média do sinal (cps) de sete pontos utilizados para construção da curva de calibração em ICP OES para as amostras de músculo bovino

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal (cps)
Média	2,49	1201,5
Desvio padrão	2,49	237,068
Média	4,98	2341,4
Desvio padrão	4,98	126,0135
Média	9,95	4715,6
Desvio padrão	9,95	70,07026
Média	24,88	13503,9
Desvio padrão	24,88	487,5276
Média	49,75	24467,9
Desvio padrão	49,75	865,6126
Média	74,63	36372,2
Desvio padrão	74,63	520,7959
Média	99,5	49063,5
Desvio padrão	99,5	1198,294

Desvio padrão médio dos sete pontos do músculo: **411,4425**

Tabela 42 - Leitura da média do sinal (cps) de sete pontos utilizados para construção da curva de calibração em ICP OES para amostras de rim bovino

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal (cps)
Média	2,49	1136,36
Desvio padrão	2,49	97,10766
Média	4,98	2383,851
Desvio padrão	4,98	229,9932
Média	9,95	4678,351
Desvio padrão	9,95	282,1626
Média	24,88	12602,95
Desvio padrão	24,88	851,981
Média	49,75	24475,62
Desvio padrão	49,75	968,4708
Média	74,63	34378,04
Desvio padrão	74,63	2191,895
Média	99,5	47614,19
Desvio padrão	99,5	1402,67

Desvio padrão médio dos sete pontos do Rim: **752,0053**

Tabela 43 - Leitura da média do sinal (cps) de sete pontos utilizados para construção da curva de calibração em ICP OES para amostras de fígado bovino

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal (cps)
Média	2,49	1157,4
Desvio padrão	2,49	163,0817
Média	4,98	2370,0
Desvio padrão	4,98	90,65339
Média	9,95	4773,6
Desvio padrão	9,95	272,7405
Média	24,88	12352,0
Desvio padrão	24,88	1034,377
Média	49,75	22673,30
Desvio padrão	49,75	851,1425
Média	74,63	34384,6
Desvio padrão	74,63	1058,054
Média	99,5	46923,9
Desvio padrão	99,5	2605,103

Desvio padrão médio dos sete pontos do Fígado: **869,5903**

O resultado encontrado para as amostras de músculo bovino foi uma reta com coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9981$) demonstrando uma linearidade muito alta do método na matriz músculo bovino (**Tabela 44 e Figura 28**). Para as amostras de rim bovino, a regressão resultou em coeficiente com $r^2 = 0,9951$ (**Tabela 45 e Figura 29**) e para o fígado bovino, o valor de r^2 foi de 0,9950 (**Tabela 46 e Figura 30**). Estes resultados atendem a legislação vigente (Brasil, 2011a; Brasil, 2011b; Anvisa, 2017) e os resultados encontrados para rim e fígado bovinos estão abaixo do resultado encontrado para as amostras de músculo bovino.

De acordo com a Anvisa (2017), o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser ($r^2 = 0,99$). Brasil (2011a) e Brasil (2011b), no entanto, descrevem que o mínimo deve ser r^2 igual a 0,995.

Tabela 44 - Regressão dos dados obtidos da leitura dos sete pontos em amostras de músculo bovino para determinação da linearidade

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99905647
R-Quadrado	0,99811384
R-quadrado ajustado	0,99805668
Erro padrão	768,393972
Observações	35

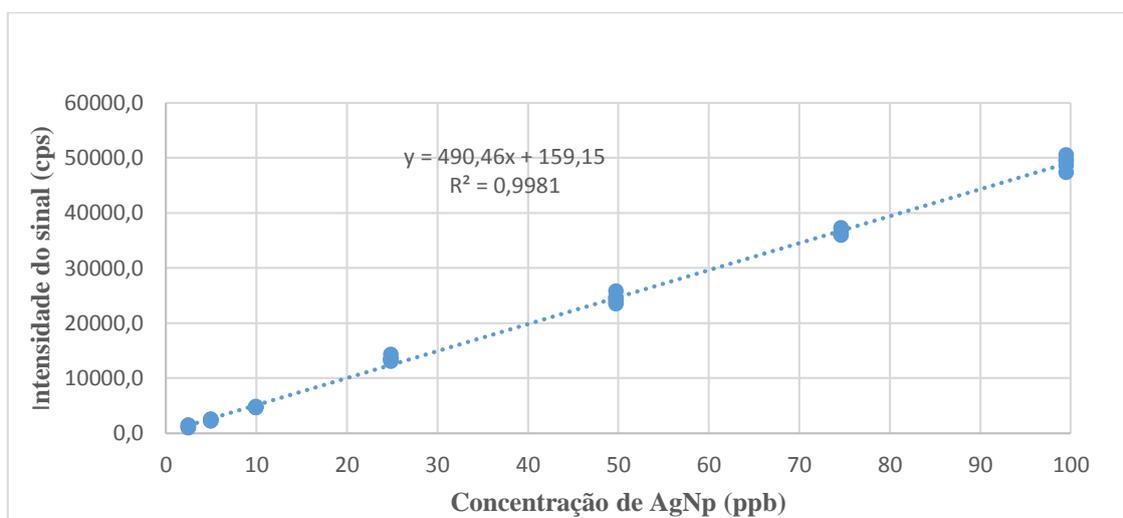


Figura 28 - Resultado da regressão com uma reta de sete pontos para determinação da Linearidade nas amostras de músculo bovino fortificadas com Ag Np nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75; 74,63 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.

Tabela 45 - Regressão dos dados obtidos da leitura dos sete pontos em amostras de rim bovino para determinação da linearidade

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997535039
R-Quadrado	0,995076155
R-quadrado ajustado	0,994953058
Erro padrão	1193,593359
Observações	42

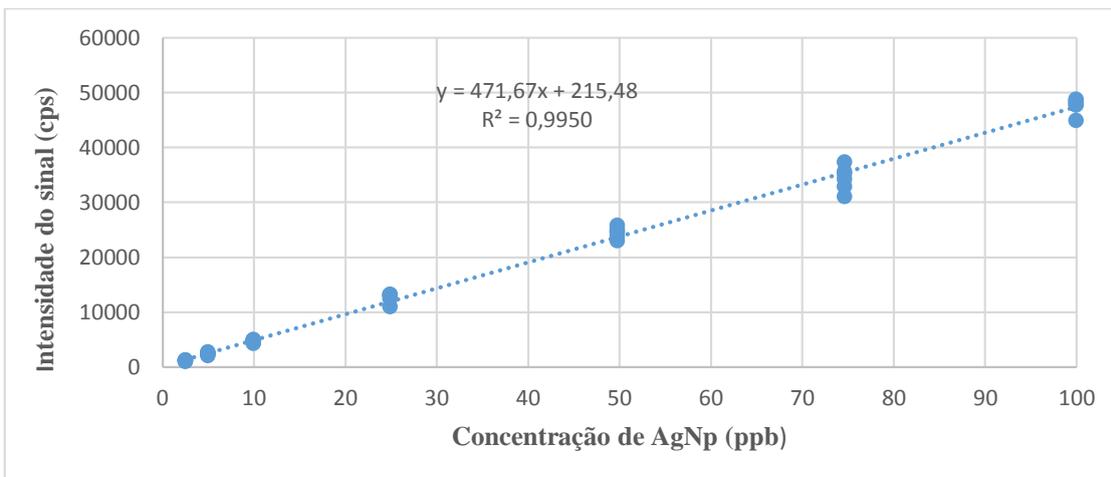


Figura 29 - Resultado da regressão com uma reta de sete pontos para determinação da Linearidade nas amostras de rim bovino fortificadas com Ag Np nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75; 74,63 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.

Tabela 46 - Regressão dos dados obtidos da leitura dos sete pontos em amostras de fígado bovino para determinação da linearidade

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997
R-Quadrado	0,995
R-quadrado ajustado	0,995
Erro padrão	1190,234
Observações	42,000

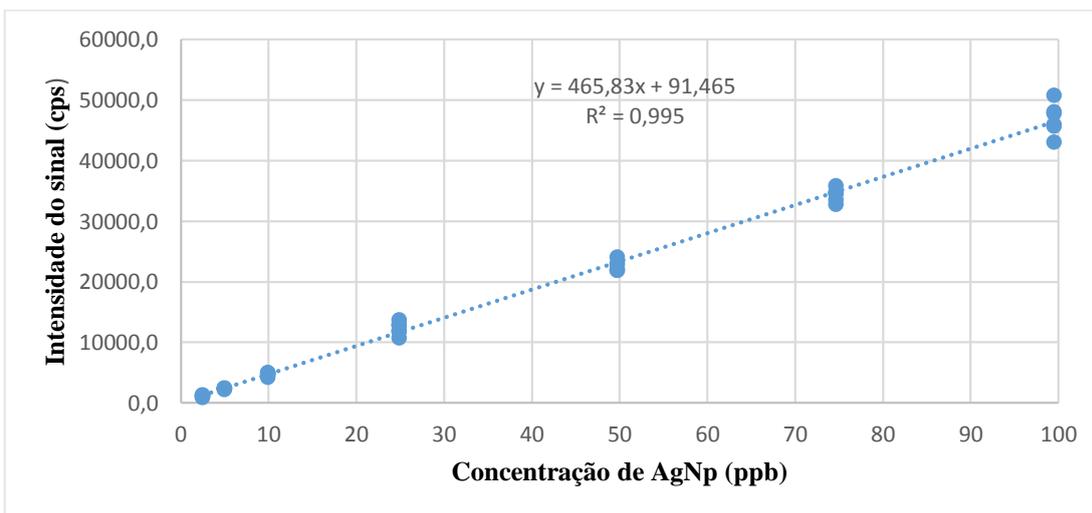


Figura 30 - Resultado da regressão com uma reta de sete pontos para determinação da Linearidade nas amostras de fígado bovino fortificadas com Ag Np nas concentrações de 2,49; 4,98; 9,95; 24,88; 49,75; 74,63 e 99,5 ppb, analisadas em equipamento de ICP OES.

Após a confirmação da normalidade dos dados, foi verificado a homocedasticidade para os resultados de cada uma das três matrizes analisadas pelo teste de Levene (**Tabela 47**, **Tabela 48** e **Tabela 49**).

Tabela 47 - Teste de homocedasticidade das variáveis da intensidade do sinal (cps) em amostras de músculo bovino fortificadas com diferentes concentrações de AgNp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,605	6	28	0,009

Tabela 48 - Teste de homocedasticidade das variáveis da intensidade do sinal (cps) em amostras de rim bovino fortificadas com diferentes concentrações de AgNp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,091	6	35	0,003

Tabela 49 - Teste de homocedasticidade das variáveis da intensidade do sinal (cps) em amostras de fígado bovino fortificadas com diferentes concentrações de AgNp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,295	6	35	0,000

3.3 Precisão

Da mesma forma que ocorreu no capítulo anterior com o leite, o método foi preciso para as três matrizes avaliadas, pois o coeficiente de variação mensurado pelo Desvio Padrão Relativo (DPR) foi menor que 30% nas concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb, seguindo a orientação da legislação vigente (Brasil, 2011a; Brasil, 2011b). De acordo com os cálculos, encontraram-se valores de 4,9485; 3,759 e 4,0178 % para o primeiro dia nas amostras de músculo bovino e de 5,5905; 4,2493 e 4,8546% para o segundo dia, nas concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb, respectivamente (**Tabela 50**).

Em relação às amostras de rim bovino, os resultados do primeiro dia foram de 3,0298; 5,3281 e 4,2312%, e no segundo dia, de 6,8249; 6,3799 e 6,1350%, ambos em 9,95; 49,75 e 99,5 ppb, respectivamente (**Tabela 51**). Para o fígado, seguindo os mesmos níveis de concentração, os resultados foram de 4,0636; 6,9673 e 4,2032% para o primeiro dia, e de 5,4129; 6,9123 e 6,0510% para o segundo dia (**Tabela 52**).

Tabela 50 - Leitura do sinal (cps) das concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão para amostras de músculo bovino no primeiro e segundo dia

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal no primeiro dia(cps)	Intensidade do sinal no segundo dia(cps)
1	9,95	4742,1	4811,478
2	9,95	4840,3	4460,269
3	9,95	4767,2	4798,684
4	9,95	4219,5	4827,681
5	9,95	4751,5	4240,748
6	9,95	4802,5	4897,064
MÉDIA	9,95	4687,2	4672,654
DP	9,95	231,9425	261,2274
DPR	9,95	4,9485	5,5905
1	49,75	23676,9	24782,37
2	49,75	23783,3	22848,24
3	49,75	24032,7	24871,59
4	49,75	21697,0	24729,98
5	49,75	23890,6	22927,39
6	49,75	23815,1	25079
MÉDIA	49,75	23482,6	24206,43
DP	49,75	882,7343	1028,614
DPR	49,75	3,759	4,2493
1	99,5	44508,5	48728,79
2	99,5	47475,6	49670,83
3	99,5	48601,1	46886,46
4	99,5	43819,9	49302,14
5	99,5	45592,0	45863,37
6	99,5	47167,8	43755,83
MÉDIA	99,5	46194,1	47367,9
DP	99,5	1856,03	2299,531
DPR	99,5	4,0178	4,8546

Tabela 51 - Leitura do sinal (cps) das concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão para amostras de rim bovino no primeiro e segundo dia

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal no primeiro dia(cps)	Intensidade do sinal no segundo dia(cps)
1	9,95	4725,1	4782,717
2	9,95	4872,5	4837,327
3	9,95	4505,5	4242,824
4	9,95	4795,0	4985,734
5	9,95	4895,1	4383,768
6	9,95	4846,5	5016,715
MÉDIA	9,95	4773,3	4708,181
DP	9,95	144,6236	321,3297
DPR	9,95	3,0298	6,8249
1	49,75	24954,3	24078,97
2	49,75	22804,1	25439,17
3	49,75	21971,1	21982,45
4	49,75	25072,7	25796,75
5	49,75	24595,2	24979,62
6	49,75	24447,8	22695,01
MÉDIA	49,75	23974,2	24162
DP	49,75	1277,38	1541,523
DPR	49,75	5,3281	6,3799
1	99,5	45757,3	50605,12
2	99,5	51068,6	51991,45
3	99,5	49114,2	47081,63
4	99,5	50177,5	45148,18
5	99,5	47545,5	51654,46
6	99,5	46825,5	52789,62
MÉDIA	99,5	48414,8	49878,41
DP	99,5	2048,53	3060,055
DPR	99,5	4,2312	6,1350

Tabela 52 - Leitura do sinal (cps) das concentrações de 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para determinação da precisão para amostras de fígado bovino no primeiro e segundo dia

Tratamento	Concentração (ppb)	Intensidade do sinal no primeiro dia (cps)	Intensidade do sinal no segundo dia(cps)
1	9,95	4756,0	4916,499
2	9,95	4376,6	4706,465
3	9,95	4699,2	4855,066
4	9,95	4531,9	4232,543
5	9,95	4554,7	4777,358
6	9,95	4273,5	4527,948
MÉDIA	9,95	4532,0	4669,313
DP	9,95	184,1643	252,7494
DPR	9,95	4,0636	5,4129
1	49,75	22015,4	24917,39
2	49,75	27189,9	23197,87
3	49,75	24028,5	22341,4
4	49,75	24139,2	25263,82
5	49,75	25200,8	24788,4
6	49,75	23987,5	21218,65
MÉDIA	49,75	24426,9	23621,26
DP	49,75	1701,917	1632,789
DPR	49,75	6,9673	6,9123
1	99,5	47982,0	49289,25
2	99,5	48995,8	50331,85
3	99,5	48772,0	45239,26
4	99,5	50198,7	51251,34
5	99,5	46102,4	50277,66
6	99,5	44776,1	44299,07
MÉDIA	99,5	47804,5	48448,07
DP	99,5	2009,366	2931,64
DPR	99,5	4,2032	6,0510

3.4 Limite de detecção (LD)

De acordo com a fórmula sugerida por Brasil (2011b), o limite de detecção foi de **0,085035 ppb** para as amostras de músculo bovino; de **0,074163 ppb** para as amostras de rim bovino e de **0,0736107 ppb** para as amostras de fígado bovino, conforme cálculos descritos abaixo:

$$LD (\text{músculo}) = 3 \times S$$

$$LD = 3 \times 0,028345$$

$$LD (\text{músculo}) = \mathbf{0,085035 \text{ ppb}}$$

$$LD (\text{rim}) = 3 \times S$$

$$LD = 3 \times 0,024721$$

$$LD (\text{rim}) = \mathbf{0,074163 \text{ ppb}}$$

$$LD (\text{fígado}) = 3 \times S$$

$$LD = 3 \times 0,024536918$$

$$LD (\text{fígado}) = \mathbf{0,0736107 \text{ ppb}}$$

3.5 Limite de quantificação (LQ)

O LQ calculado (Brasil, 2011b) foi de **0, 28345 ppb** para as amostras de músculo bovino, **de 0,24721 ppb** para as amostras de rim bovino e de **0,24536918 ppb** para as de fígado bovino, conforme cálculos descrito abaixo.

$$\text{LQ (músculo)} = 10 \times S$$

$$\text{LQ} = 10 \times 0,028345$$

$$\text{LQ (músculo)} = \mathbf{0, 28345 \text{ ppb}}$$

$$\text{LQ (rim)} = 10 \times S$$

$$\text{LQ} = 10 \times 0,024721$$

$$\text{LQ (rim)} = \mathbf{0,24721 \text{ ppb}}$$

$$\text{LQ (fígado)} = 10 \times S$$

$$\text{LQ} = 10 \times 0,024536918$$

$$\text{LQ (fígado)} = \mathbf{0,24536918 \text{ ppb}}$$

3.6 Acurácia

A acurácia de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor que é aceito como um valor verdadeiro, convencional ou um valor de referência aceito e o valor encontrado. Isso às vezes é chamado de veracidade (ICH, 1994; VIM, 2012).

De acordo com a recomendação de Brasil (2011a), os valores calculados para verificação da acurácia foram de 82,9045% na concentração de 9,95 ppb; 80,408% para 49,75 ppb e 91,1798% na concentração de 99,5 ppb para as amostras de músculo bovino. Para as amostras de rim bovino, o resultado demonstrou uma recuperação semelhante ao observado na matriz anterior, sendo 85,2763% em 9,95 ppb, 80,9949% em 49,75 ppb e 91,8633% em 99,5 ppb. Em relação às amostras de fígado bovino, os valores também ficaram dentro da mesma faixa de recuperação. Na concentração de 9,95 ppb, o valor foi de 86,7336%; de 80,1427% na concentração de 49,75 ppb e na concentração de 99,5 ppb, foi de 89,9889% (**Tabela 53**), com cálculos demonstrados abaixo.

Todos os resultados, nas três matrizes avaliadas, apresentam valores dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação (Brasil, 2011b), que indicam que concentrações entre $1 \mu\text{g/Kg} \leq C < 10 \mu\text{g/Kg}$ intervalos entre 70 e 110%. Para concentrações entre $10 \mu\text{g/Kg} \leq C < 100 \mu\text{g/Kg}$, os intervalos situam-se entre 80 a 110%.

Tabela 53 - Recuperação percentual das concentrações de AgNp (ppb) em amostras de músculo, rim e fígado bovino após leitura em equipamento de ICP OES

	Leitura		
	Concentração das amostras fortificadas (ppb)	Concentração média das amostras recuperadas (ppb)	Recuperação (%)
Músculo	9,95	8,249	82,9045
	49,75	40,003	80,408
	99,5	90,724	91,1798
Rim	9,95	8,485	85,2763
	49,75	40,295	80,9949
	99,5	91,404	91,8633
Fígado	9,95	8,630	86,7336
	49,75	39,871	80,1427
	99,5	89,539	89,9889

Músculo:

$$\text{Frec (9,95 ppb)} = 8,249 - 0,0 / 9,95 \times 100$$

$$\text{Frec (9,95 ppb)} = \mathbf{82,9045\%}$$

$$\text{Frec (49,75 ppb)} = 40,003 - 0,0 / 49,75 \times 100$$

$$\text{Frec (50 ppb)} = \mathbf{80,408\%}$$

$$\text{Frec (99,5 ppb)} = 90,724 - 0,0 / 99,5 \times 100$$

$$\text{Frec (99,5 ppb)} = \mathbf{91,1798\%}$$

Rim:

$$\text{Frec (9,95 ppb)} = 8,485 - 0,0 / 9,95 \times 100$$

$$\text{Frec (9,95 ppb)} = \mathbf{85,2763\%}$$

$$\text{Frec (49,75 ppb)} = 40,295 - 0,0 / 49,75 \times 100$$

$$\text{Rrec (49,75 ppb)} = \mathbf{80,9949\%}$$

$$\text{Frec (99,5 ppb)} = 91,404 - 0,0 / 99,5 \times 100$$

$$\text{Frec (99,5 ppb)} = \mathbf{91,8633\%}$$

Fígado:

$$\text{Frec (9,95 ppb)} = 8,630 - 0,0 / 9,95 \times 100$$

$$\text{Frec (9,95 ppb)} = \mathbf{86,7336\%}$$

$$\text{Frec (49,75 ppb)} = 39,871 - 0,0 / 49,75 \times 100$$

$$\text{Rrec (49,75 ppb)} = \mathbf{80,1427\%}$$

$$\text{Frec (99,5 ppb)} = 89,539 - 0,0 / 99,5 \times 100$$

$$\text{Frec (99,5 ppb)} = \mathbf{89,9889\%}$$

3.7 Robustez

Não houve diferença significativa na comparação entre os blocos utilizados na digestão, o tempo de pré-digestão e a forma de armazenamento ($p > 0,05$), para as amostras de músculo bovino (**Tabela 54**). Em relação à interação entre os diferentes blocos digestores, o tempo de pré-digestão e as formas de armazenamento, também não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no músculo bovino.

Tabela 54 - Média da leitura dos sinais (cps) das amostras de músculo bovino na concentração de 49,75 ppb entre bloco digestor, tempo de pré-digestão e tipo de armazenamento

Tratamentos			Médias
Bloco digestor	Tempo pré-digestão	Tipo de armazenamento	Intensidade do sinal (cps)
Bloco 1	Pré-digestão 6 h	Resfriado	23892,5
		Congelado	23940,3
	Pré-digestão 12 h	Resfriado	24885,9
		Congelado	23740,2
Bloco 2	Pré-digestão 6 h	Resfriado	25230,0
		Congelado	22861,7
	Pré-digestão 12 h	Resfriado	24178,4
		Congelado	26787,0

*CV= 5,94

Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o tempo de pré-digestão para as amostras de rim bovino na concentração de 9,95 ppb (**Tabela 55**), demonstrando que o tempo de apenas 6 h de pré-digestão gerou um sinal inferior ao tempo de pré-digestão de 12 h. Em relação à forma de armazenamento das amostras de rim bovino, os testes não detectaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as amostras resfriadas e congeladas em nenhuma das três concentrações avaliadas (**Tabela 56**). Sobre a interação entre o tempo de pré-digestão e as formas de armazenamento, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no rim bovino, em nenhuma das três concentrações avaliadas.

Tabela 55 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de rim bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre os tempos de pré-digestão (6 h e 12 h)

Concentração	Pré-digestão Rim bovino		CV
	6 h	12 h	
9,95 ppb	4925,66 ^b	5352,50 ^a	6,20
49,75 ppb	25299,83 ^a	21295,16 ^a	28,56
99,5 ppb	52612,50 ^a	53754,83 ^a	1,73

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste SNK no nível de 95% de significância.

Tabela 56 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de rim bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre as formas de armazenamento (congeladas/resfriadas)

Concentração	Armazenamento Rim bovino		CV
	Congelado	Resfriado	
9,95 ppb	5258,83	5019,33	6,20
49,75 ppb	21880,66	24714,33	28,56
99,5 ppb	53146,66	53220,66	1,73

Em relação ao fígado bovino, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para os diferentes tipos de pré-digestão (**Tabela 57**). Porém, em relação ao tipo de armazenamento, nas concentrações de 9,95 ppb e 99,5 ppb, as amostras congeladas apresentaram uma intensidade de sinal menor ($p \leq 0,05$) em relação às amostras resfriadas (**Tabela 58**).

Tabela 57 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre os tempos de pré-digestão (6 h e 12 h)

Concentração	Pré-digestão Fígado bovino		CV
	6 h	12 h	
9,95 ppb	4514,166 ^a	4671,333 ^a	3,39
49,75 ppb	23131,5000 ^a	23333,333 ^a	4,27
99,5 ppb	45460,0000 ^a	47090,6666 ^a	3,63

Tabela 58 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino com 9,95; 49,75 e 99,5 ppb para a variação entre as formas de armazenamento (congeladas/resfriadas)

Concentração	Armazenamento Fígado bovino		CV
	Congelado	Resfriado	
9,95 ppb	4485,666 ^b	4699,8333 ^a	3,39
49,75 ppb	22852,1666 ^a	23612,666 ^a	4,27
99,5 ppb	45153,833 ^b	47396,833 ^a	3,63

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste SNK no nível de 95% de significância.

A interação entre os dois tempos de pré-digestão e as formas de armazenamento foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) quando se compararam o tempo de pré-digestão de 6 h e o congelamento das amostras na concentração de 49,75 ppb (**Tabela 59**).

Tabela 59 - Média da leitura dos sinais (cps) entre amostras de fígado bovino com 49,75 ppb para a variação entre as formas de armazenamento (congeladas/resfriadas) e tempo de pré-digestão (6 h e 12 h)

Tempo	Pré-digestão X Armazenamento fígado bovino 49,75 ppb		
	Congelado	Resfriado	CV
6 h	22060,66 ^{aB}	24202,00 ^{aA}	6,20
12 h	23643,66 ^{aA}	23023,00 ^{aA}	28,56

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si com 95% de significância ($p \leq 0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si com 95% de significância ($p \leq 0,05$).

4 Discussão

Os resultados encontrados nas três matrizes analisadas são semelhantes aos valores descritos no capítulo anterior referente à validação em leite. A digestão utilizando o HNO₃ na pré-digestão e nas primeiras horas de aquecimento em bloco digestor, e em seguida a introdução do HCl resultaram em dados consistentes. Porém, houve necessidade de ajustes desta metodologia para digestão do músculo, rim e fígado, visto que os altos teores de proteína e lipídeos causam um excesso de “espuma” nos tubos digestores durante o aquecimento, dificultando a digestão em altas temperaturas. As “espumas” são formas coloidais de gases que se formam devido a agitação de uma solução com proteínas, em função da desnaturação parcial e do desdobramento das cadeias

polipeptídicas (Miquelin, 2010). Para o processo de digestão nestas três matrizes, a temperatura foi mais baixa no início do processo de digestão ácida no bloco digestor (90° C), com aumento gradual até atingir um equilíbrio e estabilidade do líquido dentro dos tubos digestores (110° C). Em seguida, o método foi o mesmo descrito no capítulo anterior na validação do leite.

Em um trabalho para validar uma metodologia de análise de minerais em carne de frango, Bou et al. (2004) relataram que o uso da digestão úmida em ácido é mais eficiente para análises em ICP OES e ICP MS, apresentando valores muito baixos de variação. Nossos resultados comprovam a citação anterior, pois, todos os tópicos exigidos pela legislação (Brasil, 2011a; Brasil, 2011b) estão de acordo com as normas para o músculo, rim e fígado.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na seletividade e na especificidade das três matrizes avaliadas, sendo que a digestão das amostras, o armazenamento ou leitura do sinal no equipamento de ICP OES da Ag não tiveram interferência com a inclusão do Al. Estes dados são condizentes com a literatura e com nossos achados referentes ao capítulo anterior em leite. Vários trabalhos demonstram que o ICP OES é utilizado para diversas análises multielementares simultâneas (Dahlquist e Knoll, 1978; Sandroni e Smith, 2002). De acordo com o fabricante do equipamento, algumas amostras podem conter elementos incomuns que poderiam contribuir com interferências espectrais (METHOD 6010B, 1996). Porém, não observamos interferências do outro analito em nossos resultados.

A linearidade é outro componente básico do processo de validação, e corresponde à capacidade do método em fornecer sinais diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, em função de uma faixa de aplicação (ICH, 1995). O sinal medido pelo equipamento de ICP OES gera uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas deste elemento (Augusto et al., 1997). O presente trabalho identificou uma correlação matemática pela regressão linear, chamada de *curva analítica*, com todos os coeficientes maiores ($r^2 = 0,995$) utilizando sete pontos com diferentes concentrações. Estes resultados nas três matrizes analisadas mostram que o método além de linear é bastante confiável, visto que a legislação (ICH, 1996; Brasil, 2011a; Brasil, 2011b; INMETRO, 2016; Anvisa, 2017) propõe uma reta de no mínimo cinco pontos.

Após a confirmação da normalidade dos dados na linearidade, verificou-se a homocedasticidade para os resultados de cada uma das três matrizes analisadas pelo teste de Levene, teste de igualdade de médias, eficiente para avaliação de dados normais (Almeida et al., 2008). Outras formas de avaliar a homocedasticidade das variâncias consistem em confeccionar um gráfico de dispersão de resíduos em torno da reta de concentração ou confeccionar um outro gráfico com o desvio-padrão das respostas replicadas em cada nível de concentração em função da concentração dos padrões de calibração (Brasil, 2011b).

Portanto, os achados descritos na linearidade demonstram uma segurança e confirmam os resultados encontrados na precisão e na acurácia, em que todos os valores estão dentro da faixa estabelecida, sendo que na precisão, os resultados apresentados seguem a orientação de Brasil (2011a), que determina em condições de repetitividade, um coeficiente de variação abaixo de dois terços dos valores estipulados pelo Guia de Validação (Brasil, 2011b).

O maior coeficiente de variação encontrado na precisão nas três matrizes avaliadas foi de 6,9673% no primeiro dia de leitura para o fígado. O valor encontrado é bem abaixo do nível de um terço sobre os 30% de variação permitido pela legislação (Brasil, 2011a).

Da mesma forma que ocorreu no Capítulo anterior referente ao leite, em concentrações mais baixas de AgNp, o equipamento é mais preciso, sendo a faixa ideal entre 3,98 e 39,8 ppb. Porém, quando se calcula a precisão com as amostras fortificadas com três diferentes concentrações, a concentração de 99,5 ppb teve uma recuperação melhor em relação a 9,95 ppb, demonstrando que pode haver diferença na precisão do equipamento em relação a matrizes mais sólidas como o músculo bovino, rim bovino e o fígado bovino em comparação com o leite, ou em função do maior teor de gordura e proteína das três amostras de tecidos.

Os valores de LD (entre 0,0736107 e 0,085035 ppb) e de LQ (entre 0,24536918 ppb e 0,28345 ppb) demonstram que os valores teóricos se aproximam dos valores observados durante os testes de determinação da sensibilidade utilizados no capítulo anterior referente ao leite. Nos testes, verificamos que o equipamento de ICP OES realiza leituras até o valor mínimo de 0,4975 ppb. Ressalta-se, no entanto, que não foi feita leitura em amostras com valores inferiores para comprovação do menor valor detectado.

O método foi robusto para as amostras de músculo bovino analisadas, demonstrando que, apesar do alto nível de gordura das amostras, o uso de dois blocos diferentes e as variações no tempo de pré-digestão não alteraram o processo de digestão. Este dado é importante, pois um menor tempo de pré-digestão otimiza o uso de equipamentos e agiliza o processo de análise. O fato de o congelamento não alterar o resultado é um fator importante quando se trata de envio de amostras de locais mais distantes do laboratório, como fazendas ou indústrias localizadas no interior. Quanto ao uso de blocos digestores diferentes, a alteração não interfere no desempenho do método.

Em relação ao rim bovino, a diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o tempo de pré-digestão de 6 h e 12 h na concentração de 9,95 ppb indica que em uma concentração mais baixa, é necessário um tempo de 12 h de pré-digestão em HNO₃. Esse resultado sugere que mesmo sendo uma matriz com menor teor de gordura em relação ao músculo bovino, a diferença na constituição do tecido, sugere um tempo maior de pré-digestão.

Para as amostras de fígado bovino, não houve diferença ($p > 0,05$) para os diferentes tipos de pré-digestão, mas, em relação ao tipo de armazenamento, as amostras congeladas nas concentrações de 9,95 ppb e 99,5 ppb, apresentaram uma intensidade de sinal menor ($p \leq 0,05$) em relação às amostras resfriadas. Da mesma forma, foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) na interação entre os dois tempos de pré-digestão e as formas de armazenamento quando se compara o tempo de pré-digestão de 6 h e o congelamento das amostras na concentração de 49,75 ppb. Portanto, nas três concentrações avaliadas, o congelamento tem interferência na intensidade do sinal nas amostras de fígado bovino, o que demonstra que o congelamento como forma de armazenamento não seja adequado para esta matriz.

Os resultados deste estudo estão de acordo com trabalhos semelhantes, como descrito por Peters et al. (2014) que validaram uma metodologia para detecção de prata em carne de frango por ICP MS por digestão enzimática e obtiveram resultados semelhantes. Da mesma forma, Loeschner et al. (2015) também obtiveram resultados compatíveis. Porém, no trabalho dos autores supracitados, o método consistiu na digestão enzimática da carne de frango, na separação das AgNp por tamanho utilizando o fracionamento do fluxo de campo e a quantificação final por ICP MS. Nos dois trabalhos, os autores revelaram que as AgNp se ligam rapidamente à matriz de alimentos e é difícil extraí-las completamente. Portanto, a ligação das AgNp com a matriz exige

um bom método de digestão e extração, caso contrário haverá dificuldade para uma boa recuperação em matrizes como músculo, rim e fígado.

5 Conclusão

Os ensaios preliminares demonstraram que é necessária adaptação do método de digestão e extração para uso em diferentes matrizes. O processo de digestão ácida em bloco digestor necessita de ajustes na temperatura e no tempo de aquecimento em virtude de variações na composição da matriz.

A metodologia utilizada para músculo, rim e fígado gerou um sinal de qualidade, comprovando que o método de digestão e extração das amostras foi muito eficiente e conseguiu um bom nível de recuperação. Todas as exigências estabelecidas pela legislação vigente foram atendidas para os requisitos obrigatórios, para as três matrizes avaliadas. Os valores referentes para seletividade e especificidade, linearidade, precisão, LQ, LD e acurácia estavam dentro do estabelecido pela legislação citada.

De acordo com a legislação brasileira, o cálculo da robustez é obrigatório. Portanto, a verificação deste item se torna necessária em função de diferença na intensidade do sinal entre prováveis variações que possam ocorrer durante a digestão das amostras. No músculo bovino, o método mostrou-se robusto, mas para o rim e o fígado, foram demonstradas diferenças, quando exposto a algumas variações da metodologia básica utilizada. Os achados deste ensaio demonstram a necessidade de uma pré-digestão em HNO₃ de no mínimo 12 h e a refrigeração como a melhor forma de transporte e armazenamento das amostras, sendo que alterações nestes itens geram um sinal de menor intensidade.

Portanto, o método é muito eficiente quando estabelecida uma rigidez para o processo de digestão e abertura das amostras. Destacam-se ainda que prováveis variações no método podem interferir na qualidade do sinal gerado pelo equipamento de ICP OES.

6 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A.; ELIAN, S.; NOBRE, J. Modificações e alternativas aos testes de Levene e de Brawn e Forsythe para igual de variâncias e médias. **Revista Colombiana de Estatística**, v. 31, n. 2, p. 241-260, 2008.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providencias**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em 28 de janeiro de 2018.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. **Faixa linear de uma curva de calibração**. Campinas, 1997. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/bra/ag/tda8/flduc3/flducde.htm#>. Acesso em 06 de Novembro de 2017.

BOU, R.; GUARDIOLA, F.; PADRO, A.; PELFORTB, E.; CODONYA, R. Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken

meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.19, p.1361–1369, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Acesso em 14 de setembro de 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2011a. 72 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 14 de agosto de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011b. 227 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 16 de agosto de 2016.

DAHLQUIST, R.L.; KNOLL, J.W. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Analysis of biological materials and soils for major, trace, and ultra-trace elements. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 32, p. 1-29, 1978.

FERREIRA, F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GAILLET, S.; ROUANET, J. M. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.77, p. 58–63, 2015.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ – CGCRE – 008)**, Revisão 05, 2016

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Guidance for Industry. Q2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>. Acesso em 27 de julho de 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2 (R1)**, 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>. Acesso em 27 de julho de 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95)**, 1995.

LOESCHNER, K.; NAVRATILOVA, J.; GROMBE, R.; LINSINGER, T.P.J.; KØBLER, C.; MØLHAVE, K.; LARSEN, E.H. In-house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v.181, p. 78–84, 2015.

METHOD 6010B. INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY. CD-ROM, Revision 2, 1996.

MIQUELIM, J. N. **Avaliação reológica e microscópica de espumas tipo *Marsmallow***. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor, São Paulo, 2010.

NEFZGER, M.; KREUTER, J.; VOGES, R.; LIEHL, E.; CZOK, R. Distribution and elimination of polymethyl methacrylate nanoparticles after peroral administration to rats. **Journal of Pharmacy Science**, v.73, p.1309–1311, 1984.

PARK, K.; PARK, E.-J.; CHUN, I.K.; CHOI, K.; LEE, S.H.; YOON, J. Bioavailability and Toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. **Archives of Pharmacol Research**, v.34, p.153–158, 2011.

PETERS, R. J. B.; RIVERA, Z. H.; VAN BEMMEL, G.; MARVIN, H. J. P.; WEIGEL, S.; BOUWMEESTER, H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, p.3875–3885, 2014.

SANDRONI, V.; SMITH, C.M.M. Microwave digestion of sludge, soil and sediment samples for metal analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.468, p. 335-344, 2002.

VILA, A., SANCHEZ, A., TOBIO, M., CALVO, P., ALONSO, M.J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, p.15-24, 2002.

VIM - **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados** (VIM 2012), 1ª Edição Luso Brasileira, Duque de Caxias, INMETRO, 2012.

Capítulo 4: Infecção experimental de vacas em lactação por *Staphylococcus aureus* e tratamento com nanopartículas de prata (AgNp)

1 Introdução

Nos últimos anos, questões como o uso intensivo de medicamentos na produção de leite, especialmente antimicrobianos, vem se propagando, com um intenso debate na Comunidade Internacional sobre outras possibilidades e formas de amenizar o uso destas substâncias no sistema de produção. Assim, há necessidade de novos produtos, bem como avaliar a sua eficácia frente a vários microrganismos patogênicos e de risco a saúde humana. Pesquisas têm focado em novas alternativas como as AgNp, que estão sendo intensamente estudadas e pesquisadas, sem dados consistentes, no entanto, sobre o real efeito antimicrobiano, tóxico e acumulativo.

Pesquisas têm demonstrado que existe uma possibilidade do uso de AgNp no tratamento de vacas leiteiras, principalmente no controle da mastite. Alguns trabalhos têm focado no tratamento do *S. aureus* com o uso das AgNp (Cho et al., 2005; Ruparelia et al., 2008; Ayala-Núñez et al., 2009; Gavilanes, 2010; Dehkordi et al., 2011; Sadeghi et al., 2012; Singh et al., 2014; Jang et al., 2015; Yah et al., 2015). Outra possibilidade de aplicação das AgNp para tratamento de *S. aureus* se baseia na associação com antimicrobianos tradicionais (Akram et al., 2016; Jamaran e Zarif, 2016). Porém, a maioria das pesquisas tem se dedicado apenas a estudos *in vitro*.

A avaliação *in vitro* para determinação da eficácia de um novo produto para controle da mastite não se faz apenas com os resultados de MIC, sendo necessária uma avaliação *in vivo*, associada a uma série de análises laboratoriais para confirmação da eficácia do produto. Da mesma forma, testes de toxicidade *in vitro* são uma excelente opção para verificar os efeitos colaterais. Porém, não são suficientes para uma avaliação real em células ou tecidos *in vivo*, sendo necessárias avaliações em animais e em condições de produção.

O uso de animais para tais experimentos deve ser rigorosamente delineados e seguir padrões internacionais para uso e coleta de dados (CONCEA, 2013). O uso destes animais deve ser explorado ao máximo, bem como a coleta de informações, visto que muitos estudos e várias hipóteses devem ser respondidas com o uso mínimo de animais, otimizando tempo, dinheiro e a vida de seres vivos.

O experimento descrito neste capítulo teve o objetivo de avaliar a eficiência das AgNp para o tratamento de *S. aureus* inoculado na glândula mamária de vacas em lactação, o efeito tóxico das AgNp sobre os animais tratados, a presença de resíduos no leite durante a lactação, e a ocorrência de resíduos no músculo, rim e fígado dos animais após eutanásia e necrópsia.

2 Material e Métodos

Experimento autorizado de acordo com Protocolo CEUA UFMG 12/2017 (Anexo 1) e Protocolo CEUA Embrapa Gado de Leite 14/2015 (Anexo 2).

2.1 Diagnóstico microbiológico – Identificação dos microrganismos

Para início do experimento, fez-se uma avaliação microbiológica de vários animais para identificação das vacas negativas. O isolamento bacteriano foi feito a partir de leite coletado de cada quarto mamário antes da ordenha, após cuidadosa antissepsia dos tetos com álcool 70%. Os jatos de leite foram coletados diretamente em frascos estéreis, colocados em caixas isotérmicas com gelo e encaminhados para o Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais. Volumes de 10 µL de cada amostra foram semeados com alça calibrada e descartável em cada quadrante de uma placa de ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro, e incubadas a 35 °C, por 24 horas, de acordo com as recomendações de Oliver et al. (2004).

Após o período de incubação, realizou-se a leitura das placas, observando-se o crescimento microbiano, aspecto e coloração das colônias bem como o número de colônias crescidas. Em seguida, as placas foram incubadas novamente a 35 °C por mais 24 horas, realizando-se novamente a leitura das placas após o período total de 48 horas de incubação. Nas amostras de leite em que houve crescimento de microrganismos, selecionou-se uma colônia representativa, a qual foi semeada em ágar BHI (*Brain Heart Infusion* – Infusão de cérebro e coração), e incubada a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, as amostras foram examinadas ao microscópio após a coloração de Gram e submetidas ao teste de catalase para então serem identificadas por meio de uma bateria de testes bioquímicos de identificação presuntiva.

2.2 Inoculação e mastite experimental

Após o teste *in vitro*, fez-se a inoculação experimental em seis animais sem diagnóstico de mastite clínica e negativos para *S. aureus* (vacas em lactação de descarte do rebanho mestiço do Centro Nacional de Gado de Leite em Coronel Pacheco – MG, com produção média de 20 Kg e todas acima de quatro lactações) (*i.e.* com três isolamentos negativos intervalados de uma semana), com a infusão de uma amostra de *S. aureus* (amostra n° 619) obtida da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, considerada de maior resistência contra os principais antimicrobianos testados no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG. A concentração bacteriana utilizada foi de 10.000 UFC/quarto mamário posterior esquerdo e anterior direito de cada animal, com o inócuo preparado de acordo com a metodologia citada no item 2.3 do Capítulo 1. A infusão bacteriana foi realizada após limpeza e higienização com uma solução de ácido láctico e antissepsia com álcool 70% embebido em algodão.

2.3 Avaliação clínica

Após a inoculação, os animais foram isolados em uma baia do *free-stall* do setor de produção de gado mestiço, no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite em Coronel Pacheco – MG, e manejados de acordo com a rotina da fazenda. Eram ordenhados pela manhã e à tarde em equipamento DeLaval modelo Linha Média com 8 conjuntos de ordenha, equipado com extratores automáticos e medidores eletrônicos de leite modelo MM27 e contenção tipo espinha de peixe. Após observação da ocorrência de mastite clínica pelo teste de caneca de fundo escuro e por sinais clínicos por palpação da glândula e inspeção visual, foram avaliados parâmetros como aumento da temperatura do quarto inoculado, rubor, edema, aumento da temperatura corporal e alterações na anatomia da glândula. Fez-se um exame clínico diário às 6 h e 18 h durante todo o período pré-

experimento, após a inoculação experimental e tratamento com as AgNp. O exame clínico dos animais foi realizado de acordo com o protocolo de estudo/experimento CMB.

Fez-se, após 24 h e 72 h de inoculação, uma coleta de leite para análise microbiológica e confirmação da infecção experimental. Após 24 h e no quinto dia após o tratamento com as AgNp, realizaram-se novas coletas de leite para análise microbiológica e isolamento, avaliação da eficiência do tratamento, seguindo a metodologia descrita anteriormente para coleta e análises.

Em relação ao processo inflamatório, coletou-se uma semana antes da inoculação experimental, uma alíquota de 40 mL de leite de cada quarto mamário para avaliação da CCS. As amostras foram colhidas no início da ordenha e submetidas ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG (LQL Embrapa), acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável, onde foram submetidas às análises laboratoriais em equipamento eletrônico quanto aos teores de gordura, proteína e contagem de células somáticas no equipamento eletrônico CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda) que combina o princípio de Transformada de Fourier no infravermelho médio e citometria de fluxo, respectivamente. As análises para determinação da composição do leite foram realizadas segundo IDF (2000) e a contagem de células somáticas segundo IDF (1995).

Após 48 h da inoculação experimental, fez-se nova coleta de amostra para análise de CCS e de composição de cada quarto mamário para verificar a evolução do quadro inflamatório. No quinto dia após o tratamento com as AgNp, fez-se a terceira coleta de leite para análises de CCS e de composição do leite, seguindo a mesma metodologia de coleta e análise descrita anteriormente.

Em todos os procedimentos foram seguidas as recomendações que normatizam ensaios clínicos de terapias contra mastite contidas no Boletim 247 do International Dairy Federation (Throburn, 1990).

2.4 Imagens termográficas

As imagens termográficas foram capturadas três dias antes da inoculação experimental até três dias depois do tratamento com AgNp. A temperatura da superfície do úbere foi determinada com o dispositivo portátil FLIR T420 (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, OR, EUA) nas regiões anatômicas: lateral do quarto anterior direito, posterior (PD e PE) e lateral do quarto posterior esquerdo; com o animal contido em um brete de contenção. A câmera era direcionada para a superfície do úbere e padronizou-se a distância do termógrafo à região anatômica em um metro de distância do quarto mamário, 20°C de temperatura de reflectância e adotou-se 0,98 como valor de emissividade, conforme recomendação do fabricante para tecidos biológicos e de acordo com os valores utilizados por Menegassi et al. (2014). Os arquivos gerados foram processados e interpretados pelo software FLIR Tools 5.6 (FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA).

A temperatura (T°C) e a umidade relativa (UR%) do ambiente foram colhidas concomitantemente ao momento em que eram capturadas as fotos termográficas pelo próprio equipamento de captura das imagens. Estes dados foram utilizados para calcular o índice de temperatura e umidade (ITU) segundo a equação proposta por Thom (1959): $ITU = 0,8 * T^{\circ}C + UR\% / 100 * (T^{\circ}C - 14,4) + 46,4$.

2.5 Tratamento com AgNp

Após o diagnóstico clínico pela presença de grumos no leite nos quartos mamários inoculados, fez-se a aplicação das AgNp no quarto posterior direito, após 72 h de inoculação, em dose única.

O tratamento foi realizado com AgNp pura Sigma-Aldrich (cat. n° 576832) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de 100 nm, na concentração de 2,5 mg/mL, sendo calculada a dose em função da produção de leite de cada vaca (**Tabela 60**), com concentração mínima de 2,5 mg de AgNp por L de leite. As AgNp foram pesadas em balança de precisão Shimadzu Modelo AUW 220 D (Maryland 21046, U.S.A.) e diluídas em uma solução Ringer Lactato. A suspensão de AgNp em Ringer Lactato foi sonicada em equipamento (Hielscher UP 200 S (Hielscher Ultrasonics GmbH - Oderstr 53 D-14513, Teltow, Alemanha), potência 300 W, ciclo de 1,0 e amplitude de 100% em banho de gelo, e em seguida, foi acondicionada em uma seringa estéril para infusão nos animais, após higienização com uma solução própria para “*pre-dipping*” a base de ácido láctico e antissepsia com álcool 70% embebido em algodão.

Tabela 60 - Concentração da suspensão de AgNp para cada uma das seis vacas tratadas contra mastite por *S. aureus*

Animal (número)	Concentração por animal (g)
01	3,53
02	3,213
03	6,575
04	3,575
05	3,187
06	5,688

Uma vez aplicada a formulação, os animais passaram por avaliação clínica, com o intuito de identificar eventual mastite química ou mesmo agravamento do quadro clínico de seis em seis horas, seguindo as recomendações que normatizam ensaios clínicos de terapias contra mastite contidas no Boletim 247 do International Dairy Federation (Throburn, 1990).

Todas as etapas do processo de inoculação, avaliação clínica e tratamento com a suspensão de AgNp estão descritas na **Tabela 61**.

Tabela 61 - Descrição do cronograma com as etapas de inoculação, avaliação clínica e tratamento das vacas com AgNp

Procedimento	Data
Coleta p/ Microbiologia	Três coletas com intervalo de uma semana pré-inoculação
Coleta p/ CCS	27/11/2017
Imagens termográficas	28/11/2017 a 06/12/2017
Inoculação experimental	30/11/2017
Coleta p/ microbiologia	01/12/2017
Observação de sinais clínicos pós-inoculação e pré-tratamento	30/11/2017 a 03/12/2017
Coleta p/ microbiologia	03/12/2017
Coleta p/ CCS	03/12/2017
Tratamento c/ AgNp	03/12/2017
Coleta p/ microbiologia	04/12/2017
Observação dos sinais clínicos pós-tratamento	04/12/2017 a 08/12/2017
Coleta p/ CCS	07/12/2017
Coleta p/ microbiologia	08/12/2017
Coleta p/ análises de Ag em leite	04/12/2017 a 08/12/2017
Eutanásia dos animais	08/12/2017
Coleta p/ análises de Ag em músculo, rim e fígado	08/12/2017

2.6 Detecção dos resíduos de AgNp no leite das vacas tratadas com AgNp

Após o tratamento em dose única com as AgNp, os animais foram avaliados por um período de cinco dias, com coleta de 40 mL de leite na ordenha da tarde de cada quarto mamário. Em seguida, as amostras foram congeladas e enviadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, para secagem em estufa a 105°C, pré-digestão com HNO₃ e digestão ácida em bloco digestor, seguindo a mesma metodologia descrita nos capítulos anteriores.

A análise de prováveis resíduos de Ag no leite foi realizada utilizando o ICP – OES (PerkinElmer, Inc. 940 Winter Street Waltham, MA 02451 USA), de acordo com metodologia descrita por Silva e Queiroz (2006).

2.7 Eutanásia e coleta de fragmentos de necropsia das vacas tratadas com AgNp

Após cinco dias do tratamento com as AgNp, foram realizadas eutanásia e necrópsia para verificação da distribuição da suspensão de AgNp no úbere e coleta de fragmentos de fígado, rim e músculo (*Longissimus dorsi*) para verificação de resíduos de Ag no ICP-OES.

Coletaram-se fragmentos de glândula mamária (AD, AE, PD, PE), teto (AD, AE, PD, PE), pulmão, baço, linfonodos retro-mamário (esquerdo e direito), além de músculo, rim e fígado para histologia e verificação da presença de AgNp em microscópio eletrônico de transmissão.

A eutanásia foi realizada de acordo com a metodologia sugerida pelo CONCEA (2013), utilizando aplicação de 1,5 mL/100 Kg de pv de cloridrato de xilazina a 2% por via intravenosa em dose única, em seguida tiopental sódico na dose de 25 mg/Kg de pv por via intravenosa em dose única, e para finalizar, 20 mL de cloridrato de lidocaína a 2% por via intracranial em dose única.

As amostras de tecidos para leitura no ICP-OES foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável para envio ao Laboratório de Análise de Alimentos na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG. No laboratório, as amostras de fígado, rim e músculo foram pesadas (10 g por amostra) e acondicionadas (em duplicata) em tubos digestores de 75 mL. Após secagem em estufa a 105°C, foram encaminhadas para uma pré-digestão com HNO₃ e após 12 h digeridas, segundo a metodologia descrita no Capítulo 3. Após a finalização do preparo, foram acondicionadas em frascos Pleion de 40 mL e, em seguida, foi feita a leitura em equipamento de ICP - OES para verificar a presença de resíduo de Ag nas amostras.

As amostras destinadas à histologia e à leitura em microscópio eletrônico de transmissão foram acondicionadas (em duplicata) em criotubos em uma solução de formol.

2.8 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, sendo utilizados seis animais, totalizando 24 quartos mamários (seis quartos mamários (PE) para o tratamento com AgNp e seis quartos mamários (AD) para o grupo controle). A unidade amostral foi quarto mamário, uma vez que um único quarto mamário possui interdependência dos demais (Blagitz et al., 2015). As variáveis qualitativas foram submetidas a estatística descritiva para avaliação do resultado do tratamento (curado ou não curado).

Em relação à avaliação da CCS, os resultados para as amostras foram avaliados após transformação em log de base 10 e avaliado pelo Teste t para comparação das médias entre os diferentes dias de coletas, antes e depois da inoculação e após o tratamento.

3 Resultados

3.1 Diagnóstico microbiológico – Identificação dos microrganismos

Os resultados microbiológicos de três análises pré-inoculação realizadas com intervalo de uma semana, confirmaram que os seis animais do experimento estavam negativos para *S. aureus*. As coletas e análises foram realizadas em todos os quartos mamários. Porém, alguns animais apresentaram infecção por outros microrganismos de menor interesse como o *Staphylococcus aureus* (SNA) e *Streptococcus* ambientais (**Tabela 62**).

Tabela 62 - Resultados das análises microbiológicas de três coletas realizadas com intervalo de uma semana em todos os quartos mamários dos seis animais do experimento pré-inoculação

Animal	Quartos mamários			
	AD	AE	PD	PE
01				
02	SNA			
03				<i>Streptococcus</i> ambiental
04				
05		<i>Streptococcus</i> ambiental	<i>Klebsiella</i>	
06		SNA	SNA	SNA

3.2 Inoculação e mastite experimental

3.2.1 Avaliação clínica

Após 12 h de inoculação da amostra número 619 de *S. aureus*, obtida da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, considerada de maior resistência contra os principais antimicrobianos testados no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, observou-se discreto aumento no tamanho e na temperatura do PE e AD de alguns animais. A confirmação dos sinais clínicos da mastite induzida foi realizada 24 h após a inoculação. Durante o teste da caneca de fundo escuro no momento da ordenha, foram observados grumos e alterações visuais no leite dos quartos inoculados.

Por meio do exame clínico realizado de 12 em 12 horas após a inoculação, observaram-se alterações nos dias subsequentes, com detecção da mastite clínica em todos os quartos inoculados (Anexo 3).

3.2.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas de leite dos quartos mamários inoculados (AD e PE), coletado após 24 h e 72 h, detectaram 100% de quartos positivos para *S. aureus*. Após 24 h e no quinto dia após o tratamento com AgNp detectou-se também a presença de *S. aureus* em 100% dos quartos inoculados, e inoculados/tratados com AgNp.

3.2.3 Análises da CCS

Os resultados das amostras de leite coletadas pré-inoculação, pós-inoculação e pós-tratamento (**Tabela 63**), demonstram que não houve diferença significativa ($P = 0,999$) entre as amostras de leite coletadas para avaliação da CCS.

Tabela 63 - Resultado das amostras de CCS coletadas pré-inoculação, pós-inoculação com amostra de *S. aureus* e pós-tratamento com AgNp em números absolutos e em Log de base 10

VACAS	COLETAS					
	27/11/2017 Pré- inoculação		03/12/2017 Pós-inoculação		07/12/2017 Pós-tratamento	
	Log 10	CCS x 1000	Log 10	CCS x 1000	Log 10	CCS x 1000
01 AD	2,140	138	NR	NR	3,113	1296
01 AE	2,560	363	2,668	466	3,069	1172
01 PD	2,551	356	2,695	495	3,066	1163
01 PE	2,544	350	3,978	9500	NR	NR
02 AD	3,306	2023	3,367	2328	NR	NR
02 AE	3,978	9500	3,798	6276	3,978	9500
02 PD	3,287	1938	2,910	813	NR	NR
02 PE	3,309	2037	3,215	1640	NR	NR
03 AD	3,153	1423	3,076	1191	3,978	9500
03 AE	2,718	522	2,307	203	2,648	445
03 PD	2,721	526	2,624	421	2,248	177
03 PE	2,775	595	3,452	2830	NR	NR
04 AD	2,155	143	2,678	476	NR	NR
04 AE	2,307	203	2,236	172	2,279	190
04 PD	2,107	128	2,068	117	2,146	140
04 PE	2,248	177	2,850	708	NR	NR
05 AD	2,751	563	3,310	2042	NR	NR
05 AE	2,882	762	2,303	201	2,984	964
05 PD	3,797	6273	3,280	1906	NR	NR
05 PE	1,663	46	3,978	9500	NR	NR
06 AD	2,255	180	3,706	5080	NR	NR
06 AE	1,968	93	2,396	249	2,961	914
06 PD	1,763	58	2,354	226	2,661	458
06 PE	2,662	459	3,539	3460	NR	NR

*NR = Não realizado

Porém, nas amostras coletadas após o tratamento com as AgNp nos quartos PE e AD de todos os animais não foi possível fazer a leitura, pois a alta concentração de secreções no AD e a presença visível de resíduos de AgNp no PE, impossibilitaram a leitura das amostras pela citometria de fluxo, havendo possibilidade de danos ao equipamento.

3.2.4 Imagens termográficas

As imagens capturadas pela câmera termográfica antes (**Figura 31** a e b) e depois da inoculação experimental (**Figura 32** a e b) demonstram que o processo inflamatório evoluiu e é visível o

aumento da temperatura no AD, sendo observado um ligeiro aumento do fluxo sanguíneo no teto do quarto AD (Figura 32 b).

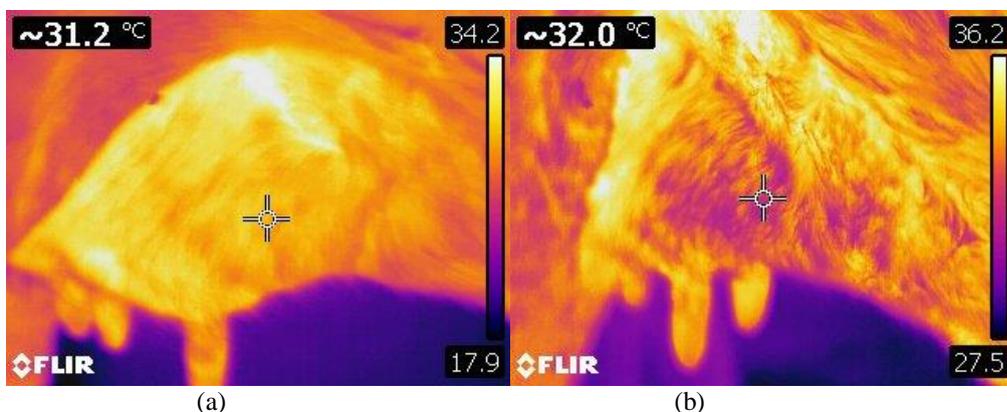


Figura 31 - Imagens termográficas do AD antes da inoculação experimental de *Staphylococcus aureus* (amostra 619) em quartos mamários de seis vacas

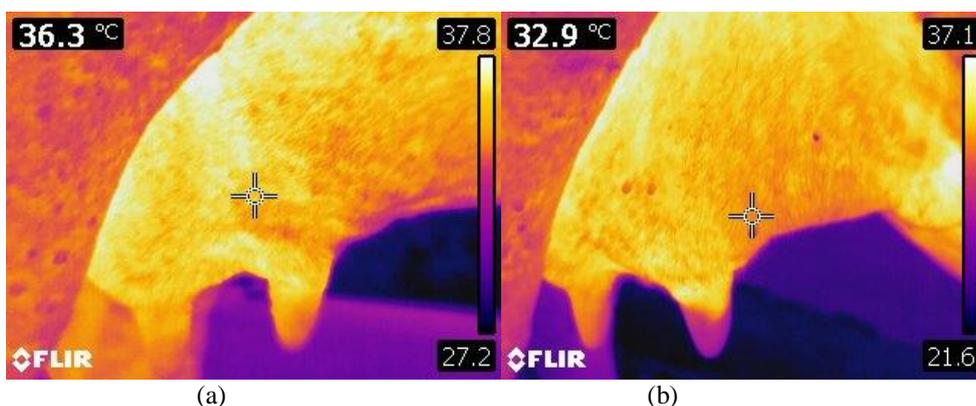


Figura 32 - Imagens termográficas do AD após a inoculação experimental de *Staphylococcus aureus* (amostra 619) em quartos mamários de seis vacas

3.2.5 Tratamento com AgNp

Após o sétimo dia de inoculação experimental com *S. aureus* e o quinto dia de tratamento com as AgNp, a avaliação clínica demonstrou cura clínica apenas em um dos quartos mamários inoculado (AD), sugerindo cura espontânea. Em relação aos seis quartos inoculados e tratados com AgNp (PE), três quartos mamários, ou seja 50%, não apresentaram sinais clínicos da inflamação. Em dois quartos mamários houve diminuição dos sinais clínicos e em um único quarto mamário, não houve presença de grumos, mas o leite estava viscoso e com aspecto alterado (Tabela 64).

Tabela 64 - Presença de alterações no leite durante avaliação com a caneca de fundo escuro no quinto dia após o tratamento com AgNp

Animal	Quartos mamários			
	AD	AE	PD	PE
01	Muito grumo	Sem alterações	Sem alterações	Pouco grumo
02	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
03	Muito grumo	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
04	Grumo	Sem alterações	Sem alterações	Leite viscoso
05	Grumo	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
06	Muito grumo	Sem alterações	Sem alterações	Pouco grumo

Apesar da ausência de alterações em alguns quartos mamários (Tabela 64), os resultados das análises microbiológicas demonstram que 100% dos quartos inoculados e tratados com AgNp continuaram positivos para *S. aureus*. No entanto, na checagem pelo teste da caneca de fundo escuro no início da ordenha, foi observado que em alguns animais tratados, o quadro clínico foi abrandado após o quarto dia da aplicação das AgNp. Em relação ao quadro clínico geral dos animais, não houve alterações significativas na temperatura corporal avaliada pela temperatura retal. Houve apenas alterações na conformação, tamanho e temperatura dos quartos mamários e tetos inoculados e tratados com AgNp (Anexo 3).

3.2.6 Detecção dos resíduos de Ag no leite das vacas tratadas com AgNp

As análises realizadas em equipamento de ICP – OES detectaram altas concentrações de Ag a partir da primeira coleta (24 h). Porém, no quinto dia de coleta (120 h), as amostras analisadas apresentaram apenas concentrações elevadas no PE com valores entre 3915,461 e 11629,065 ppb. Apenas três amostras dos demais quartos não tratados (AD) apresentaram Ag no quinto dia (120 h) de coleta, sendo o maior valor de 15,267 ppb (**Tabela 65**).

Tabela 65 - Concentração de prata em leite de vacas com mastite, tratadas com AgNp na concentração de 2,5 mg/ L leite produzido. Tempo de coleta: 24; 48; 72; 96; e 120h após o tratamento

Animal	Concentração de Ag				
	24 h (ppb)	48 h (ppb)	72 h (ppb)	96 h (ppb)	120 h (ppb)
01 AD	166,903	591,004	177,894	11,408	2,011
01 AE	24,258	137,094	ND	ND	ND
01 PD	68,780	1508,083	35,144	ND	ND
01 PE	123,525	3998,048	477,864	6284,905	7736,248
02 AD	295,808	55,493	ND	118,579	ND
02 AE	462,932	ND	335,969	132,476	ND
02 PD	780,630	25,263	381,490	291,949	ND
02 PE	2230,714	1332,663	3498,351	1720,043	5532,543
03 AD	93,386	166,017	75,992	599,338	ND
03 AE	861,832	309,588	ND	ND	ND
03 PD	16,273	119,484	104,045	ND	ND
03 PE	161,350	1339,323	1414,049	616,682	4575,005
04 AD	327,067	158,990	ND	40,681	14,832
04 AE	187,428	69,929	22,023	ND	ND
04 PD	546,366	6,328	125,075	15,313	ND
04 PE	1945,679	4223,273	99,621	697,005	11629,065
05 AD	72,029	54,555	ND	ND	ND
05 AE	127,015	167,703	ND	11,344	ND
05 PD	15,596	14,035	ND	ND	ND
05 PE	320,283	2478,060	8392,336	4513,988	3915,461
06 AD	89,251	110,412	118,493	29,144	15,267
06 AE	330,173	275,181	25,827	288,342	ND
06 PD	517,188	75,503	106,128	9,858	ND
06 PE	1601,473	9882,001	1046,469	870,024	10157,410

*ND = não detectado

3.2.7 Eutanásia e coleta de fragmentos de necrópsia das vacas tratadas com AgNp

3.2.7.1 Leitura de amostras em ICP – OES de músculo, rim e fígado das vacas tratadas com AgNp

As amostras de músculo, rim e fígado coletadas após a eutanásia dos seis animais inoculados e tratados com AgNp no PE foram analisadas em equipamento de ICP OES. O resultado demonstrou presença de resíduos de Ag em altas concentrações em todas as amostras de fígado. No músculo e no rim não foi encontrada nenhuma amostra com resíduos de Ag (**Tabela 66**).

Tabela 66 - Resíduos de prata em músculo, rim e fígado de vacas com mastite e tratadas com AgNp na concentração de 2,5 mg/L de leite produzido. Tempo de coleta: 120h após o tratamento.

Amostra	Concentração de Ag		
	Músculo (ppb)	Rim (ppb)	Fígado (ppb)
01	ND	ND	1575,3865
02	ND	ND	1069,366
03	ND	ND	2384,937
04	ND	ND	1368,035
05	ND	ND	896,0755
06	ND	*NR	541,112

*NR = Amostra não analisada

* ND = não detectado

4 Discussão

O resultado das análises microbiológicas realizadas antes do início do experimento demonstrou que os animais testados não eram portadores de *S. aureus*. Foram realizadas três coletas com intervalo de uma semana, de acordo como o preconizado pelo *National Mastitis Council* (NMC), sendo que a cultura bacteriológica pode ser considerada como padrão-ouro quando comparada com outros métodos de diagnóstico para a mastite (Pyörälä, 2003). A coleta de duas ou mais amostras fornecem dados mais consistentes a respeito da presença de alguns microrganismos, entre estes, *S. aureus* (Dohoo et al., 2011a; Dohoo et al., 2011b).

Porém, a presença de alguns microrganismos foi detectada nas análises preliminares no início do experimento, como *Staphylococcus* não *aureus* (SNA) e *Streptococcus* ambientais. Tal observação era esperada, visto que os animais utilizados são provenientes de animais de descarte do rebanho de gado puro do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite da Embrapa, em Coronel Pacheco – MG e possuíam problemas de prolapso de esfíncter, hiperqueratose e extremidade de teto invertida, facilitando o acúmulo de sujidades e a contaminação por alguns microrganismos (Coban et al., 2009).

Como o foco do trabalho se concentra na avaliação do *S. aureus*, a presença destes microrganismos secundários, aparentemente não interferiram no aparecimento de sinais clínicos nas avaliações realizadas antes da inoculação experimental. Porém, 24 h após a inoculação com a amostra de *S. aureus* utilizada, observaram-se os primeiros sinais clínicos do processo inflamatório nos quartos mamários inoculados (AD e PE), como aumento acentuado do tamanho do linfonodo supramamário do lado esquerdo em uma das vacas; discreto aumento no volume e na temperatura dos quartos mamários PE e AD em quatro animais. Porém, o aparecimento de alterações sistêmicas ou aumento de temperatura corporal não foi observado em nenhum animal. De forma contrária, Lazzari et al. (2014) relataram perda de apetite em vacas inoculadas com 1000 UFC de amostras de *S. aureus*/quarto mamário a partir do terceiro dia de inoculação e aumento da temperatura corporal em 100% dos animais. Da mesma forma, Bannermann et al. (2004) detectaram febre a partir de 32 h, após infecção experimental com *S. aureus*, sendo a temperatura máxima registrada de 39,4°C. Atalla et al. (2009) observaram elevação de temperatura em 60% das vacas inoculadas com *S. aureus*, cinco dias após inoculação com *S. aureus*. Porém, alterações sistêmicas não foram detectadas por Petzl et al. (2008) e por Martins Filho et al. (2007) após inoculação com amostra de *S. aureus*, fato que também não foi observado neste estudo.

Após 48 h da inoculação experimental, os sinais do processo inflamatório evoluíram bastante, sendo observado aumento dos quartos mamários inoculados e dos tetos, bem como a presença de grumos no leite durante o exame do teste da caneca de fundo escuro, constatando a presença de mastite clínica nos 12 quartos inoculados. Após 72 h, ou seja, antes do tratamento com as AgNp, ocorreu maior agravamento dos sinais clínicos nos quartos mamários inoculados, como aumento da temperatura local e alterações visuais no leite, confirmando a presença da mastite clínica por *S. aureus*. A mastite é caracterizada como clínica quando ocorrem sinais evidentes de inflamação, como edema do quarto afetado, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, grumos, pus ou outras alterações das características do leite (Santos e Fonseca, 2007; Langoni, 2007; Barkema et al., 2009).

Após o aparecimento dos sinais clínicos da mastite induzida pela inoculação de uma amostra de *S. aureus*, a confirmação laboratorial do processo inflamatório foi realizada utilizando-se três diferentes métodos. Primeiro pela análise da CCS, que de acordo com os resultados não houve diferença entre as amostras coletadas pré-inoculação, após a inoculação e após o tratamento com as AgNp. Sugere-se que não houve tempo suficiente para uma resposta do sistema imunológico produzir células de defesa, e assim, aumentar a CCS. De forma diferente ao que acontece com *Escherichia coli*, a mastite causada por *S. aureus* se caracteriza por aumento mais moderado e tardio da CCS, devido, em parte, a uma resposta limitada às citocinas (Bannerman et al., 2004). Porém, detectou-se presença de alterações nas amostras de leite do AD e PE de todos os animais na terceira coleta (dia 07/12), sendo assim não se pode afirmar com segurança sobre as alterações nos valores da CCS após o tratamento com as AgNp.

Como segunda opção, foram feitas imagens termográficas que servem como suporte para confirmação da evolução do processo inflamatório, visto que, antes da inoculação experimental foram capturadas imagens do úbere sadio que podem balizar as imagens capturadas após a inoculação. Quando se comparam imagens anteriores à inoculação experimental (Figura 37a e b), observam-se fluxo sanguíneo e temperatura do quarto mamário compatíveis com a temperatura corporal do animal. Após a inoculação experimental (Figura 38a e b), ocorreu aumento da temperatura do quarto mamário inoculado experimentalmente, chegando a 37,8° C e grande aumento do fluxo sanguíneo no teto AD. Este aumento da temperatura no quarto mamário inoculado pela mastite é descrito na literatura. Hovinen et al., (2008) detectaram aumento de 1,0 a 1,5 °C em vacas com mastite induzida por *Escherichia coli* avaliadas por imagens termográficas.

A utilização das imagens termográficas auxilia no diagnóstico da mastite clínica ou subclínica, por auxiliar na percepção e localização de um processo inflamatório e o comprometimento de tecidos. Segundo Davis e Silva (2004), o equipamento é capaz de detectar temperatura a partir 0,05 °C e as alterações provocadas durante o processo inflamatório interferem no padrão circulatório no local da provável infecção. Desta forma, a imagem termográfica é demonstrada como um gráfico de representação da radiação emitida pela pele, sendo em seguida transformada em imagem visível. Se houver alterações no fluxo sanguíneo no local afetado ou em tecidos adjacentes, ocorrerá alteração e mudança no padrão de cor no termograma (Redaelli et al., 2013), como demonstrado no teto do AD na Figura 38b.

De acordo com Polat et al. (2010), alterações da temperatura termográfica do úbere permitem a detecção de mastites subclínicas com uma capacidade preditiva similar à do teste do CMT, sendo uma alternativa quando há impossibilidade de realização de culturas microbiológicas. Da mesma forma, Rezende (2017) relata que imagens termográficas do úbere e CCS estão fortemente

correlacionadas entre si, ou seja, quanto maior a temperatura do úbere, maior CCS e consequentemente, ocorrência de mastite subclínica.

A confirmação final do processo inflamatório e da mastite induzida por *S. aureus* foi realizada pela análise microbiológica do leite. Observa-se que 100% dos quartos mamários inoculados estavam positivos para o *S. aureus* após a inoculação experimental. O sucesso na indução da mastite era esperado, visto que a amostra utilizada é de grande virulência e resistente a grande parte dos antimicrobianos utilizados na Medicina Veterinária. Outro fator que contribuiu para a eficiência do processo foi a quantidade de inóculo utilizado (10000 UFC/quarto mamário), muito superior ao descrito por Lazzari et al. (2014), Martins-Filho et al. (2007) e Sladek et al. (2005) que inocularam 1000 UFC/quarto mamário, 2000 UFC/quarto mamário e 4000 UFC/quarto mamário, respectivamente, que possibilitou maior probabilidade de infecção e mastite induzida por *S. aureus*, estabelecendo maior colonização da glândula mamária.

Com o quadro de mastite clínica estabelecido após 72 h da inoculação experimental, fez-se o tratamento com a infusão das AgNp no PE de cada um dos seis animais, sendo a dosagem de 2,5 mg/mL determinada por MIC. Porém, houve muita dificuldade para aplicação da suspensão de AgNp no quarto mamário. Mesmo com a utilização do ultrassom para homogeneizar as AgNp no veículo utilizado para diluição e, ainda, os cuidados de agitação antes da aplicação, houve rápida sedimentação das AgNp. Nossas observações sugerem que a grande quantidade de AgNp necessária para cada quarto mamário talvez não tenha atingido a porção mais dorsal da glândula mamária. O fato descrito em relação à dificuldade de solubilização das AgNp já ocorreu durante a preparação dos tubos de Caldo MH e das placas de Ágar para a MIC. Observou-se também dificuldade de solubilização durante a exposição das células MAC-T às AgNp, nos testes de toxicidade. Após o tratamento, os animais foram avaliados clinicamente por palpação e análise visual do quarto tratado e, não foi constatada nenhuma reação tóxica ou mastite química.

Os resultados da aplicação das AgNp começaram a ser observados no quarto dia após o tratamento, com diminuição dos grumos na caneca de fundo escuro, regressão do edema e da temperatura no quarto mamário tratado. A ausência de grumos ou anormalidade no leite avaliada pela caneca de fundo escuro foi observada em três animais no quinto dia após o tratamento, sugerindo a cura clínica destes animais. De forma contrária, houve nos quartos inoculados experimentalmente e não tratado (AD), aumento dos sinais clínicos em três animais, como excesso de grumos no teste da caneca de fundo escuro, edema do quarto mamário e aumento de temperatura local. Em dois animais, os sinais clínicos ficaram estáveis e no AD de uma das vacas houve desaparecimento dos sinais clínicos de forma espontânea. De acordo com Pankey et al. (1985), a taxa de cura espontânea em mastite por *S. aureus* é de 21%. Já as taxas de recuperação espontânea encontradas por Soback et al. (1990); Nickerson et al. (1991) e Faria et al. (1996), variaram de 33% a 48%. Oliver et al. (2004) encontraram taxas de recuperação espontânea de 10,5%, sendo que em primíparas a cura espontânea é duas vezes maior do que em multípara (Reeve-Johnson e Nickerson, 2017). Barkema et al. (2004) observaram taxa de cura entre 4 a 92% para *S. aureus* e Oliver et al. (2004) encontraram 36% com uso prolongado de ceftiofur. Barkema et al. (2006) descreveram que as taxas de cura para *S. aureus* variam consideravelmente e que elas diminuem com o aumento da idade da vaca e em função do número de colônias bacterianas no leite antes do tratamento. No Brasil, Malacco et al. (2013), usando o cefalônio anidro como tratamento para vaca seca, relataram taxa de cura de 70% para *S. aureus*.

Todos estes fatores citados relacionam-se com os animais avaliados, pois as seis vacas inoculadas e tratadas com AgNp já possuem mais de quatro lactações e foram induzidas por inoculação

experimental de *S. aureus* em concentração de 10.000 UFC/quarto mamário. Estes fatores podem contribuir para o agravamento dos sinais clínicos e a dificuldade de cura. Os autores supracitados também relatam que a mastite por *S. aureus* nos quartos posteriores tem baixa taxa de cura em relação aos quartos anteriores.

Vários autores (Nickerson et al., 1991; Barkema et al., 2006; Gabadage et al., 2017) citam que o tratamento da mastite clínica durante a lactação é muito variado, sendo as taxas de recuperação de 40% a 70%. Os valores citados são devidos às diferenças na susceptibilidade de vários microrganismos às drogas, à duração do processo infeccioso antes do tratamento, à idade do animal, ao grau de lesão do tecido glandular e do tipo de resposta inflamatória da glândula mamária diante da agressão causada pelos diferentes patógenos (Beer, 1988). A citação anterior é observada no presente estudo, pois a cura clínica de 50% dos quartos mamários tratados com AgNp não se confirmou através da análise microbiológica.

O fato de ser utilizada uma amostra de grande resistência aos antimicrobianos geralmente utilizados na Medicina Veterinária, a maior capacidade de virulência pode ter influenciado a eficiência do tratamento, visto que *S. aureus* geralmente se caracteriza pela capacidade de colonizar o tecido mamário e sobreviver dentro de células epiteliais, macrófagos e até mesmo neutrófilos (Gresham et al., 2000; Hébert et al., 2000; Lowy, 2000; Qazi et al., 2004). Associam-se a estes fatores, a característica de *S. aureus* de formar abscessos encapsulados em porções superiores do úbere, desenvolvendo uma forma subclínica que dificulta a cura bacteriológica durante lactação. Neste caso, se não houver tratamento, durante a secagem, estas bactérias podem resistir à totalidade do período seco e retornar na lactação seguinte. Em média, é possível eliminar 90 % das infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* e 70 % por *S. aureus* com o tratamento no período seco (Naztke, 1971).

É importante destacar que alguns agentes antimicrobianos convencionais não conseguem atravessar determinadas membranas celulares, tornando-os ineficazes para o tratamento de agentes patogênicos intracelulares (Yah e Simate, 2015). A utilização de AgNp de tamanho inferior a 50 nm, supostamente poderia ter uma penetração maior e ser mais eficiente contra *S. aureus*, pois teria maior capacidade de atingir a célula alvo.

Além dos aspectos já mencionados, outros fatores podem estar relacionados ao insucesso na cura microbiológica. Nossos achados *in vitro* com a mesma amostra utilizada neste ensaio demonstraram eficácia em 100% das colônias em uma dosagem de 2,5 mg/mL de AgNp. Cho et al. (2005), Ruparelia et al. (2008), Dehkordi et al. (2011) e Sadeghi et al. (2012) relataram grande eficiência das AgNp contra *S. aureus* em estudos *in vitro*. Porém, com AgNp de tamanho inferior. Já Ayala-Núñez et al. (2009) encontraram, *in vitro*, resultado semelhante aos nossos achados com a mesma nanopartícula comercial utilizada no experimento. Gavilanes (2010) obteve excelentes resultados *in vitro* e *in vivo* com AgNp de menor tamanho e com uma dose bem menor. Yuan et al. (2017) afirmaram que o efeito é dependente do tamanho da nanopartícula, sendo que o uso de AgNp de menor tamanho leva ao estresse oxidativo das células e diminui as defesas antioxidantes. Portanto, partículas menores são mais eficazes devido à maior superfície de contato; porém, são mais tóxicas.

Como já discutido anteriormente, a necessidade de grande quantidade de AgNp e o valor muito alto da MIC sugerem questionamentos a respeito da eficiência da AgNp de 100 nm utilizada para controle *in vivo* do *S. aureus*.

Fatores associados à diluição e dispersão das AgNp no quarto mamário tratado também devem ser considerados, pois foi observado durante a execução da MIC no primeiro capítulo, que as AgNp utilizadas não dispersam bem nos meios tradicionalmente utilizados em microbiologia, sendo que para a confecção das placas de AgNp em Ágar BHI, foi necessário resfriar imediatamente a suspensão após serem sonicadas e vertidas. Caso contrário, as AgNp sedimentariam e não haveria placas homogêneas.

No ensaio *in vivo*, a partir da primeira ordenha após o tratamento, foi observado que nos quartos mamários tratados com AgNp não “vazavam” leite momentos antes da ordenha, pois, o extravasamento de leite momentos antes da ordenha ocorreu em todos os animais nas três semanas que antecederam o experimento, principalmente nos quartos mamários PD e PE. Em uma avaliação mais detalhada do ocorrido, foi constatado que as AgNp estavam sedimentando no final da cisterna do teto no PE, obstruindo o esfíncter e dificultando a saída do leite. Para comprovação desta teoria, injetaram-se 200 µL de ocitocina em duas vacas e foi observado que não saía leite no PE tratado com AgNp, ao passo que no PD, que não foi tratado, o leite saía com intensidade, sem compressão física manual.

Após uma compressão manual no teto do PE, observou-se que era necessária uma pressão maior para ordenhar o leite, e antes da saída do leite, o quarto mamário tratado secretava uma substância viscosa impregnada de prata de coloração azulada. Foi observado também, que durante a coleta de leite, para avaliação da presença de resíduos de Ag, a mesma substância sedimentava no fundo do frasco, após alguns minutos da coleta.

O fato descrito em relação a não ejeção do leite pré-ordenha, juntamente com a presença de AgNp sedimentadas no frasco de leite após a coleta, sugerem que as AgNp estavam sedimentando dentro do quarto mamário e, provavelmente, não atingiram o ápice da glândula mamária. A provável ausência de uma concentração adequada de AgNp na parte superior da glândula mamária pode favorecer o estabelecimento de uma infecção pelo *S. aureus* e isso permite que no interior da glândula mamária o *S. aureus* produza fatores anti-fagocíticos que inibam ou reduzam a ação dos neutrófilos e causem lesões nas células epiteliais secretoras, aumentando a disseminação do microrganismo e facilitando a penetração no interior da glândula mamária. Desta forma, as lesões resultam em encapsulamento, granulomas e microabscessos que interferem na ação dos antimicrobianos (Middleton, 2003).

Portanto, nossos achados sugerem que as condições anatômicas e fisiológicas dos animais utilizados neste experimento diminuem a probabilidade de cura. Além disto, a baixa solubilização e dispersão das AgNp favorecem a sedimentação e dificultam a ocorrência de níveis terapêuticos adequados em toda a glândula mamária.

Em relação a toxicidade e a produção de resíduos de Ag no leite, detectou-se alta concentração de Ag no primeiro dia (24 h) após o tratamento com AgNp.

A maioria dos animais apresentou a maior concentração de Ag nos quartos mamários não tratados (AD, AE, PD) no segundo dia (48 h). A partir do terceiro dia (72 h), as concentrações de Ag começaram a diminuir nos quartos não tratados, e no quinto dia (120 h), foi detectada Ag nos quartos não tratados, em apenas três vacas, sendo todos no AD, com o maior valor de 15,267 ppb. A detecção de Ag no AD após o quinto dia demonstra que o processo inflamatório oriundo da inoculação experimental favoreceu um maior fluxo sanguíneo e o acúmulo de resíduos no quarto mamário.

Quando se compara a quantidade de AgNp aplicada no quarto mamário de cada um dos animais, observa-se que a vaca que recebeu a maior quantidade de AgNp foi a que apresentou a maior concentração de resíduo no leite, fato esperado, pois durante as coletas de leite para análises de CCS e de resíduos para leitura no ICP OES, o quarto mamário do animal citado, deixava uma maior quantidade de resíduo no frasco com leite. As amostras dos outros animais também seguiram a mesma lógica em relação à quantidade aplicada e de resíduo observada no frasco de leite.

A maioria dos antimicrobianos comerciais utilizados para controle da mastite possuem carência variando entre dois e seis dias. Ao contrário dos medicamentos tradicionais, as AgNp utilizadas, provavelmente possuem um período de carência muito mais alto, visto que no quinto dia os valores de resíduos são bastante expressivos no PE. Desta forma é sugestivo que a prata pode estar acumulando no ápice da glândula mamária nas primeiras horas após a aplicação e posteriormente começa a precipitar na cisterna da glândula, ocorrendo um aumento da quantidade de resíduos após o quinto dia.

Após a eutanásia e necrópsia, não foi detectada Ag no rim e nem no músculo dos animais tratados com AgNp. No fígado, no entanto, todas as amostras estavam positivas para resíduos de Ag em análise no equipamento de ICP OES.

De acordo com Klein (1978), estima-se que apenas 10 % dos compostos de Ag coloidal ingeridos são absorvidos pelo corpo, e 2 a 4% são retidos nos tecidos. Porém, nossos achados são inferiores a estes números. Cada animal recebeu em média 3,5 g de AgNp, mas apenas uma média de 1.500 ppb foi detectada no fígado, correspondendo apenas a 0,0428 % do que foi aplicado no quarto mamário. A realização de análise de todos os órgãos e tecidos para mensurar a quantidade de resíduo em cada animal seria necessária.

Uma observação contraditória em nossos achados é a afirmação de que o rim (Wen et al., 2017) e o músculo (Van Der Zande et al., 2012) são alguns dos órgãos de maior acúmulo de Ag, juntamente com o fígado. Neste trabalho, não foram observados resíduos de Ag no rim e no músculo.

Austin et al. (2012) afirmam que as AgNp afetam o pulmão, fígado, baço e rim, penetram também no sistema nervoso central (SNC), e entram na circulação porta hepática, no sistema linfático ou no fígado (Gaillet e Rouanet, 2015), confirmando que o fígado é um dos órgãos principais de acúmulo de Ag.

5 Conclusão

A utilização das AgNp (Sigma-Aldrich (cat. n° 576832) - (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) com 100 nm não foi eficiente para o tratamento de vacas com mastite induzida por *S. aureus* durante a lactação. Apesar do desaparecimento dos sinais clínicos em alguns animais, as análises microbiológicas demonstraram que não houve cura microbiológica em nenhum dos quartos mamários tratados.

O uso de AgNp na glândula mamária, aparentemente, não causa nenhum prejuízo ao tecido mamário, pois não foi detectada nenhuma lesão ou injúria física causada pelas AgNp. Porém,

análises histológicas mais detalhadas devem ser realizadas para avaliação de prováveis efeitos tóxicos das AgNp nas células alveolares.

A grande quantidade de resíduo de Ag no leite (PE) e no fígado dos animais tratados após o quinto dia de tratamento sugere uma avaliação mais criteriosa do período de carência e da viabilidade do seu uso para tratamento da mastite durante o período de lactação. Novas pesquisas devem ser realizadas para avaliação durante o período seco. Nossos achados demonstram uma possibilidade do uso das AgNp como selante de teto associado a um antimicrobiano ou apenas como uma barreira física, sendo necessárias mais pesquisas para comprovação desta hipótese.

6 Referências Bibliográficas

AKRAM, F. E.; EL- TAYEB, T.; ABOU- AISHA, K.; EL- AZIZI, M. A combination of silver nanoparticles and visible blue light enhances the antibacterial efficacy of ineffective antibiotics against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.15, n.48, p.1-132016.

ATALLA, H.; GYLES, C.; WILKIE, B.; LESLIE, K.; MALLARD, B. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.326-334, 2009.

AYALA-NÚÑEZ, N. V.; VILLEGAS, H. H. L.; TURRENT, L. C. I. ; PADILLA, C. R. Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter. **Journal of Nanobiotechnology**, 2009.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p.463-472, 2004.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J-W.; ZHAO, X.; HOPE, J.C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n.3, p.463-472, 2004.

BAKERMA, H.W.; DINGWELL, R.T., KEFE, G.F., SAMPIMON, O.C., SOL, J. Factors associated with cure of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis during lactation. **Encontro Anual do Conselho Nacional de Mastite dos EUA (NMC)**, p. 24-34, 2004.

BARKEMA, H. W.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; ZADOKS, R. N. The role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.10, p.4717-4729, 2009.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. *Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine Staphylococcus aureus* Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1877-1895, 2006.

BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**, v. 2., São Paulo: Roca, p.3-5, 1988.

BLAGITZ, M.G.; SOUZA, F.N.; BATISTA, C.F.; DINIZ, S.A.; AZEVEDO, L.F.F.; SILVA, M.X.; HADDAD, J.P.A.; HEINEMANN, M.B.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Flow cytometric analysis: Interdependence of healthy and infected udder quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 2401-2408, 2015.

CHO, K.; PARK, J.; OSAKA, T.; PARK, S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingrediente. **Electrochimica Acta**, v.51, p.956–960, 2005.

COBAN, O.; SABUNCUOGLU, N.; TUZEMEN, N. A Study on Relationships between Somatic Cell Count (SCC) and Some Udder Traits in Dairy Cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.1, p.134-138, 2009.

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea**, Brasília, 2013. 54 p.

DAVIS, J.; SILVA V. Subtração para detecção de pessoa em imagens térmicas. **Revista Medicine e Biology**, n.23, p.79-88, 2004.

DEHKORDI, S. H; HOSSEINPOUR, F.; KAHRIZANGI, A. E. An *in vitro* evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.52, p. 10795-10797, 2011.

DOHOO, I. R.; ANDERSEN, S.; DINGWELL, R.; HAND, K.; KELTON, D.; LESLIE, K.; SCHUKKEN, Y.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n.11, p.5515-5522, 2011a.

DOHOO I. R.; SMITH, J.; ANDERSEN, S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.250–261, 2011b.

FARIA, J.E.; FIGUEIREDO, J.B.; FACURY Filho, E. J.; DALE, R.; LOPASSO JÚNIOR, O. R. Infecção estafilocócica em vacas no final da lactação e no início da seguinte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.533-541, 1996.

GABADAGE, K.; CHIRINO-TREJO, M.; CAMPBELL, J.; LUBY, C. Efficacy of recombinant bovine epidermal growth factor in the treatment of experimental subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in a ewe model. **Veterinary Record Open**, v.4, n.1, 2017.

GAILLET, S.; ROUANET, J. M. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.77, p. 58–63, 2015.

GAVILANES, K. P. V. **Estudio de la actividad antimicrobiana de nano plata sobre mastites subclínica bovina em la Unidad Productiva Tunsh**. Tese Doutorado apresentada a Escuela Superior Politécnica de Chimborago. Faculdade de Ciências. Escola de Bioquímica Y Farmácia. Para obtenção do Título de Doutor em Bioquímico Farmacêutico, 2010.

GRESHAM, H.D.; LOWRANCE, J.H.; CAVER, T.E.; WILSON, B.S.; CHEUNG, A.L.; LINDBERG, F.P. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. **Journal of Immunology**, v.164, p.3713-3722, 2000.

HÉBERT, A.; SAYASITH, K.; SÉNÉCHAL, S.; DUBREUIL, P.; LAGACÉ, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiology Letters**, v.193, p.57-62, 2000.

HOVINEN, M.; SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HOVINEN, M.; SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HÄNNINEN, L.; PASTELL, M.; AISLA, A.M.; PYÖRÄLÄ, S. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4592-4598, 2008.

International Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cell. *IDF Standard 148A*. Brussels: International Dairy Federation, 1995. 8p.

IDF. International IDF Standard 141C:2000: Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. **Guidance on the operation of mid-infrared instruments**. Brussel, 2000, 15 f.

JAMARAN, S.; ZARIF, B.R. Synergistic Effect of Silver Nanoparticles with Neomycin or Gentamicin Antibiotics on Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus*. **Open Journal of Ecology**, v.6, p.452-459, 2016.

JANG, H.; LIM, S.H.; CHOI, J.S.; PARK, Y. Antibacterial properties of cetyltrimethylammonium bromide-stabilized green silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n.10, p.1906-1912, 2015.

KLEIN, D.A. Editor. **Effects on humans**. In Environmental impacts of artificial ice nucleating agents. Stroudburg, Dowden, Hutchinson, and Ross, p.169–175, 1978.

LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e fundamentos. In: LANGONI, H., RIBEIRO, M.G., SANTOS, M.V., DOMINGUES, P.F., PINTO, J.P.A.N., NADER FILHO, A. IN: 4º ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual de São Paulo, 2007. p. 8-17.

LAZZARI, M.V.S.; OLIVEIRA, B.; MORETI, G.; GUIMARÃES, F.; KRUG, G.; NOLETO, A.J.; MESQUITA, J.P.; NEVES, A. M. Aspectos clínicos e laboratoriais da mastite induzida por inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* em vacas e búfalas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1299-1307, 2014.

LOWY, F.D. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 341-343, 2000.

MALACCO, V. M. R.; LAGE, F. L. A.; MOLINA, L. R. Effectiveness of dry cow therapy with cephalonium in microbiological cure of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Veterinaria e Zootecnia**, v.20, n.2, 2013.

MARTINS FILHO, L.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CESCO, F.T.R.S.; SICCHIEROLLI, P. B.; MELO, P. C.; FAGLIARI, J. J. Indução experimental de mastite subclínica em vacas da raça Holandesa mediante inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 25923). **Ars Veterinaria**, v.23, p.75-80, 2007.

MENEGASSI, S.R.O.; BARCELLOS J.O.J.; DIAS, E.A.; KOETZ JUNIOR, C.; PEREIRA, G.P.; PERIPOLLI, V.; MCMANUS, C.; CANOZZI, M.E.A.; LOPES, F.G. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. **International Journal of Biometeorology**, v.59, p.357-364, 2014.

MIDDLETON, J. R. *Staphylococcus aureus* mastitis: have we learned anything in the last 50 years? Proceedings National Mastitis Council Regional Meeting, Portland, Maine, p. 1-8, 2003.

NATZKE, R. P. Elements of Mastitis Control. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1431-1442, 1971.

NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; BODDIE, R.L. Progress in the development of a vaccine to control mastitis. **Louisiana Agriculture**, v.34, p.20-22, 1991.

OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.J.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H.H.; JOHNSON, D.L.; LAMAR, K.C.; CHESTER, S.T.; MOSELEY, W.M. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2393-2400, 2004.

PANKEY, J. W.; BODDIE, N. T.; WATTS, J. L.; NICKERSON, S. C. Evaluation of Protein A and a Commercial Bacterin as Vaccines Against *Staphylococcus aureus* Mastitis by Experimental Challenge. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.3, p.726-731, 1985.

PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTHER, J.; YANG, W.; SEYFERT, H.M.; NÜRNBERG, G.; SCHUBERTH, H.J. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. **Veterinary Research**, v.39, p.1-23, 2008.

POLAT, B.; COLAK, A.; CENGIZ, M.; YANMAZ, L.E.; ORAL, H.; BASTAN, A.; KAYA, S.; HAYIRLI, A. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3525-3532, 2010.

PYÖRÄLÄ S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v.34, p.565-578, 2003.

QAZI, S. N. A.; HARRISON, S. E.; SELF, T.; WILLIAMS, P.; HILL, P. J. Real-Time Monitoring of Intracellular *Staphylococcus aureus* Replication. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.4, p.1065-1077, 2004.

REDAELLI, V.; BERGERO, D.; ZUCCA, E. et al., Use of Thermography Techniques in Equines: Principles and Applications. **Journal of Equine Veterinary Science**, p.1-6, 2013

REEVE-JOHNSON, L.; NICKERSON, S. C. A large multi-centric study in the United States assessing self-cure rates in dairy cows during the dry period from mastitis due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry**, v.1, n.2, p.1-7, 2017.

REZENDE, E. S. J. **Modelo de detecção de mastite em vacas leiteiras usando termografia infravermelho**. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, na área de concentração Construções Rurais e Ambiente, Campinas, 2017.

RUPARELIA, J. P.; CHATTERJEE, A. K.; DUTTAGUPTA, S. P.; MUKHERJI, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v.4, p.707–716, 2008.

SADEGHI, B.; GARMAROUDI, F. S.; HASHEMI, M.; NEZHAD, H. R.; NASROLLAHI, A.; ARDALAN, S.; ARDALAN, S. Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. **Advanced Powder Technology**, v.23, p.22–26, 2012.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1ªed. Barueri: Manole, 2007. p.314.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos**, 3ª Ed., Viçosa, Editora UFV, 2006.

SINGH, N.; CHAUDHARY, A.; ABRAHAM, J. Susceptibility Testing of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Biological Role of Silver Nanoparticles of Honey against MRSA. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v.4, p.5-6, 2014.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; RYZNAROVA, H.; FALDYNA, M. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis **Veterinary Research**, v.36, p.629–643, 2005.

SOBACK, S.; ZIV, G.; WINKLER, M.; Saran, M. A Systemic dry cow therapy - a preliminary report. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.661-666, 1990.

THOM, E. C. The discomfort index. **Weatherwise**, v.12, p.57-60, 1959.

THORBURN, M.A. General Principles for the design of clinical trials with special reference to mastitis therapy. **Bulletin of International Dairy Federation**, v.247, p.40- 51, 1990.

VAN DER ZANDE, M.; VANDEBRIEL, R.J.; VAN DOREN, E.; KRAMER, E.; RIVERA, Z.H.; SERRANO-ROJERO, C.S. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. **ACS Nano**, v.6, p.7427–7442, 2012.

WEN, H.; DAN, M.; YANG, Y.; LYU, J.; SHAO, A.; CHENG, X.; CHEN, L.; XU, L. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. **PLoS ONE**, v.12, n.9, 2017.

YAH, C.S.; SIMATE, G.S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.43, 2015.

YUAN, Y.; PENG, O.; GURUNATHAN, S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.569, 2017.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização das AgNp Sigma-Aldrich (cat. n° 576832) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) com 100 nm para tratamento da mastite por *S. aureus* deve ser bem avaliada, pois a difícil solubilização e estabilização das AgNp foi comprovada em vários ensaios durante a execução do nosso trabalho em laboratório e a campo.

Na preparação da MIC foi observado que as AgNp não solubilizam em Caldo MH, sendo necessário outro meio de cultura, como o ágar BHI. Porém, deve haver uma adaptação para o uso do ágar BHI para confecção de placas adicionadas de AgNp, pois se não houver um resfriamento imediato, as AgNp sedimentam no fundo da placa. Os fatos mencionados somam-se à dificuldade de diluição das AgNp em Ringer Lactato durante o tratamento das vacas com as AgNp. Neste sentido, o resultado negativo para tratamento da mastite por *S. aureus* de vacas em lactação torna necessária uma avaliação mais criteriosa a respeito do uso das AgNp para tal finalidade. Sugere-se a realização de novas pesquisas para avaliação desta estratégia de tratamento durante a lactação e avaliação de um possível tratamento com as AgNp durante o período seco.

Deve-se pensar em alternativas para o tratamento da mastite por *S. aureus* com AgNp inferiores a 50 nm. A literatura descreve que a utilização das AgNp de menor tamanho possibilita uma dosagem mais baixa e uma maior facilidade de solubilização em meios de cultura para realização de MIC, avaliação dos testes de toxicidade e tratamento de animais contaminados pela mastite.

Quanto aos efeitos tóxicos avaliados *in vitro*, a dificuldade de solubilização das AgNp para exposição das células MAC-T impossibilitou a determinação das doses tóxicas, pois não foi possível determinar se a morte dessas células foi por compressão ou por efeito tóxico das AgNp.

O processo de validação de uma metodologia para determinação de Ag em leite, músculo, rim e fígado, comprovou que o uso da pré-digestão com HNO₃ por um período de 12 h é fundamental para um bom processo de digestão. A introdução do HCl durante o aquecimento das amostras, digere a gordura de maneira satisfatória e finaliza o processo de digestão.

Os requisitos como linearidade, seletividade e especificidade, precisão, acurácia, limite de detecção e limite de quantificação ficaram dentro dos parâmetros legais estipulados pela legislação nas quatro matrizes avaliadas. Porém, o método se mostrou robusto nas amostras de leite e músculo bovino. No rim e no fígado, o método não se mostrou robusto em relação a pré-digestão de apenas 6 h e em amostras congeladas.

Portanto, a utilização do método de digestão e do equipamento de ICP OES para leitura das amostras, além de serem eficientes, é rápido, simples, de baixo custo e não necessita de uma estrutura sofisticada para digestão e abertura das amostras.

7 ANEXOS

17/01/2018

Gmail - Fwd: Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 12/2017 (CEUA-UFMG)



Renison Teles Vargas <renisontv@gmail.com>

Fwd: Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 12/2017 (CEUA-UFMG)

6 mensagens

Mônica Pinho Cerqueira <monicapinhocerqueira@gmail.com>
Para: Renison Teles Vargas <renisontv@gmail.com>

15 de maio de 2017 17:07

— Mensagem encaminhada —

De: <ceua@prpq.ufmg.br>

Data: 15 de maio de 2017 17:01

Assunto: Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 12/2017 (CEUA-UFMG)

Para: monicamopc@ufmg.br, monicapinhocerqueira@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 12/2017

Título do projeto: Determinação da excreção e biodistribuição de prata nanoparticulada (coloidal) administrada pela via intramamária em bovinos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Monica Maria O Pinho Cerqueira

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Técnicas de Inspeção em Produtos Animais

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 15/05/2017. Validade: 15/05/2017 à 14/05/2022

Belo Horizonte, 15/05/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Profa. Associada da Escola de Veterinária da UFMG

Renison Teles Vargas <renisontv@gmail.com>
Para: Mônica Pinho Cerqueira <monicapinhocerqueira@gmail.com>

15 de maio de 2017 18:55

Boa notícia Professora,

https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=f8647be346&jsve=RaRSkXQ4EEo.pt_BR.&view=pt&search=trash&th=1610014220a3bc73&siml=15c0db911a5f... 1/2



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "DETERMINAÇÃO DA EXCREÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO DE PRATA NANOPARTICULADA (COLOIDAL) ADMINISTRADAS PELA VIA INTRAMAMÁRIA EM BOVINOS", Protocolo Nº 14/2015, sob a responsabilidade de **Humberto de Melo Brandão** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, em reunião de **15/05/2015**.

Vigência do Projeto	De 01/10/2015 a 30/09/2017
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> /Bovino
Nº de Animais	6
Peso/Idade	≅ 500 Kg/4 anos
Sexo	Machos () Fêmeas (x)
Origem	Biotérios da Embrapa Gado de Leite (x) Frigorífico ()

João Batista Ribeiro
Secretário Administrativo da CEUA/EGL

Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG
Telefone: (32) 3311-7405 Fax: (32) 3311-7401 cnpgl.ceua@cnpgl.embrapa.br

Anexo 4: Avaliação clínica nos animais após inoculação com *Staphylococcus aureus* e tratamento com AgNp às 6:00 h e 18:00 h

Animal	01/12	02/12	03/12	04/12	05/12	06/12	07/12	08/12
1695 (M)	↑ discreto t°C PE e AD; T = 37,2°C;	↑ discreto t°C PE e AD; T = 37,4°C;	Sem alter. T=38,0°C	Sem alter. T=37,7°C	Sem alter. T=37,9°C	Sem alter.; T=37,5°C	Sem alter.; T=37,6°C	Sem alter.; T=37,7°C
1695 (T)	↑ discreto t°C PE e AD; T = 37,1°C	↑ discreto t°C PE e AD; T = 37,9°C;	Sem alter. T=38,6°C	Sem alter. T=38,3°C	Sem alter. T=38,4°C	Sem alter.; T=38,3°C	Sem alter.; T=38,0°C	
2132 (M)	Discreto ↑ PE e AD; T= 37,2;	Discreto ↑ PE e AD; T=37,5;	Discreto ↑ t°C PE T=37,8 °C	Discreto ↑ t°C PE T=37,4 °C	Sem alter. T=37,8°C	Discreto ↑ PE; T=37,7 °C	Discreto ↑ PE; T=38,3 °C Apresentou cio	Discreto ↑ Mama PE e AD; T=37,7°C
2132 (T)	Discreto ↑ PE e AD; T = 37,3 °C	Discreto ↑ PE e AD; T = 37,9;	Discreto ↑ t°C PE T=38,3 °C	Discreto ↑ t°C PE T=38,2 °C	Sem alter.; T=38,1°C	Discreto ↑ PE; T=37,8 °C	Discreto ↑ PE; T=38,7 °C Apresentou cio	
223 (M)	↑ LE; discreto ↑ PE e AD; T=37,4°C;	↑ LE; discreto ↑ PE e AD; T=36,6°C;	↑ LE; ↑ t°C PE e AD; T=37,1°C	↑ LE; ↑ t°C PE e AD; T=37,3°C	↑ LE; ↑ PE e AD; T=37,1°C	↑ LE; T=37,0°C	↑ LE da mama PE; T=37,3°C	↑ LE; T=37,3°C
223 (T)	↑ LE; discreto ↑ PE e AD; T=37,2°C	↑ LE; discreto ↑ PE e AD; T=37,2°C;	↑ LE; ↑ t°C PE e AD; T=38,2°C	↑ LE; ↑ t°C PE e AD; T=38,9°C	↑ LE; ↑ t°C PE e AD; T=37,8°C	↑ LE; T=37,9°C	↑ LE da mama PE; T=37,7°C	
5117 (M)	Sem alter. T=36,9°C	Sem alter. T=37,1°C	Discreto ↑ t°C PE; T=37,1°C	↑ t°C PE; T=37,3°C	Sem alter.; T=37,1°C	Sem alter.; T=37,3°C	Sem alter.; T=37,2°C	Sem alter.; T=37,1°C
5117 (T)	Sem alter. T=37,1°C	Sem alter. T=37,7°C	Discreto ↑ t°C PE; T=38,1°C	↑ t°C PE; T=39,4°C	Sem alter.; T=37,9°C	Sem alter.; T=38,1°C	Sem alter.; T=37,6°C	
1215 (M)	↑ tam. e t°C no PE; ↑ t°C AD T=38,3°C	↑ tam. e t°C no PE; ↑ t°C AD T=38,2°C	↑ tam. no PE; T=37,9°C	↑ tam. no PE; T=37,8°C	↑ tam. no PE e da mama; T=37,8°C	↓ tam. no PE e da mama; T=37,6°C	Sem alter.; T=37,5°C	Discreto ↑ PE; T=37,8°C
1215 (T)	↑ tam. e t°C no PE; ↑ t°C AD T=37,9°C	↑ tam. e t°C no PE; ↑ t°C AD T=38,5°C	↑ tam. no PE; T=38,2°C	↑ elev. tam. no PE e da mama; T=38,2°C	↑ tam. no PE e da mama; T=38,3°C	↓ tam. no PE e da mama; T=38,4°C	Sem alter.; T=37,8°C	
215 (M)	↑ elevado PE; ↑ t°C PE e AD; T=38,1°C	↑ elevado PE; ↑ t°C PE e AD; T=37,3°C	↑ elev. PE; ↑ t°C PE e AD; T=37,4°C	↑ elev. PE; ↑ t°C PE e AD; T=37,4°C	↑ elev. PE; T=37,5°C	↑ taman. PE; T=36,8°C	↑ taman. PE; T=36,9°C	Discreto ↑ PE; T=37,4°C
215 (T)	↑ elevado PE; ↑ t°C PE e AD; T=37,8°C	↑ elevado PE; ↑ t°C PE e AD; T=37,6°C	↑ elev. PE; ↑ t°C PE e AD; T=38,0°C	↑ taman. PE e da mama; T=38,3°C	↑ taman. PE; T=38,2°C	↑ taman. PE; T=37,6°C	↑ taman. PE; T=37,5°C	

