

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ALESSON RODRIGO BUENO DEBAS

**DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE UM MODELO DE BANCADA PARA
SIMULAÇÃO DE PEDILÚVIOS BOVINOS**
(Development and application of a bench model for footbath simulation in cattle)

CURITIBA

2016

ALESSON RODRIGO BUENO DEBAS

**DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE UM MODELO DE BANCADA PARA
SIMULAÇÃO DE PEDILÚVIOS BOVINOS**

(Development and application of a bench model for footbath simulation in cattle)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Clínica e Cirurgia Veterinária, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de mestre em Ciência animal.

Orientador: Prof. Dr. Rudiger Daniel Ollhoff

CURITIBA

2016



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus Curitiba

PUCPR
GRUPO MARISTA

**ATA Nº 0094 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado
EM CIÊNCIA ANIMAL DO ALUNO ALESSON RODRIGO BUENO DEBAS**

Aos trinta e um dias do mês de maio do ano de dois mil e dezesseis, às 09:00 horas, realizou-se na sala 08 da Pós-Graduação, 1º andar, Bloco Amarelo, Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da Dissertação do mestrando Alesson Rodrigo Bueno Debas, intitulada: **“DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE UM MODELO DE BANCADA PARA SIMULAÇÃO DE PEDILÚVIOS BOVINOS”**. O mestrando concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff (PUCPR), auxiliada pelos Professores Doutores Fernando Bittencourt Luciano (PUCPR) e Celso Antonio Rodrigues (FMVZ - UNESP). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada ARROVADA.

Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff (Presidente)

Assinatura Rüdiger Daniel Ollhoff

Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano (PUCPR)

Assinatura Fernando Bittencourt Luciano

Prof. Dr. Celso Antonio Rodrigues (FMVZ - UNESP)

Assinatura Celso Antonio Rodrigues

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Regiani de Fátima Terto, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 31 de maio de 2016.

Renata Ernlund Freitas de Macedo

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Regiani de Fátima Terto

Regiani de Fátima Terto

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO (CAPÍTULO 1).	14
2. REVISÃO DE LITERATURA (CAPÍTULO 2)	17
2.1. Pedilúvios no Brasil e no Mundo.	17
2.1.1. Pedilúvios usados profilaticamente.	21
2.1.2. Pedilúvios usados terapeuticamente.	23
2.2. Principais substâncias usadas em pedilúvios.	24
2.2.1 Sulfato de cobre e formaldeído.	25
2.2.2. Uso de protocolos terapêuticos envolvendo antibióticos topicamente aplicados, de forma isolada ou associada, para tratamento de doenças podais.	27
2.2.3. Outras substâncias que foram, ou que podem vir a serem testadas e utilizadas em pedilúvios.	28
3. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE PEDILÚVIO DE BANCADA VACAPED® (CAPÍTULO 3).	31
4. TESTE DE POTENCIAIS SUBSTÂNCIAS SUBSTITUTAS DO SULFATO DE COBRE E FORMALDEÍDO PARA USO EM PEDILÚVIOS BOVINOS (CAPÍTULO 4)	44
5. CONCLUSÃO (CAPÍTULO 5).	63
6. REFERÊNCIAS.	64

Aquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera.

Efésios: 3:20

AGRADECIMENTOS

A Deus por não me deixar perecer, por ter permitido esta empreitada e pela compreensão de que sem ele qualquer ciência se torna vazia de significado não restando nada além de papel e verbos sem efeito.

A minha família, amigos e colegas pelo apoio e, muitas vezes, pela compreensão nos momentos que tive de me ausentar.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, pela acolhida ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pela bolsa Marcelino Champagnat e também pela utilização da estrutura da Fazenda Experimental Galha Azul.

A Fundação Araucária pelo apoio financeiro ao projeto da chamada 24/2012, Programa de Pesquisa básica e aplicada, convênio 122 de 2014.

Não posso deixar de agradecer ao Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff, pela estruturação e idealização do trabalho, pela confiança que depositou na minha capacidade de executá-lo bem como por todo o apoio intelectual despendido.

Ao Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano, pelo apoio ao projeto, e auxílio intelectual.

Agradeço aos alunos de graduação em medicina veterinária e iniciação científica Marcus Vinicius Pissaia, Suélen Sicuro Ribeiro e Larissa Chagas, bem como ao aluno Arthur Wozniak e ao professor Valter Klein Junior pela ajuda na execução do projeto.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O Capítulo 1 apresenta uma introdução geral e os objetivos de estudo desta.

O Capítulo 2 trata da revisão de literatura nos aspectos atinentes a dissertação.

O Capítulo 3 apresenta o artigo referente ao desenvolvimento de um modelo de pedilúvio de bancada.

O Capítulo 4 apresenta os testes feitos com potenciais substâncias para uso em um pedilúvio bovino.

O Capítulo 5 é referente à conclusão geral desta dissertação.

As referências de todos os capítulos se encontram no final da dissertação.

RESUMO GERAL

Pedilúvios são recipientes instalados em corredores de entrada ou saída de ungulados, objetivando o tratamento massal ou a prevenção de doenças podais através da aplicação de substâncias como formaldeído, CuSO_4 ou antibióticos, à superfície dos dígitos. Frente aos custos elevados no uso de pedilúvios com as soluções teste, bem como a questões relacionadas ao bem-estar animal e contaminação ambiental, novas metodologias de pesquisa são necessárias. Objetivou-se criar um modelo para o desenvolvimento de novos tratamentos capazes de serem aplicados a campo para substituir o uso atual de compostos potencialmente nocivos. Para tanto foi desenvolvido um modelo de pedilúvio de bancada de pequena escala (VacaPed®). Realizamos análises no modelo de bancada do comportamento das soluções frente à matéria orgânica, desenvolvimento microbiológico (no líquido e na formação de biofilmes sobre o estojo córneo) e possíveis reações adversas locais nos dígitos, dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globolus*, *Thymus vulgaris* e taninos derivados da *Acacia mearnsii*. Os tratamentos foram aplicados em doses economicamente semelhantes ao tratamento controle positivo (CP) a base de formaldeído e CuSO_4 . O modelo foi capaz de simular a passagem dos animais pela solução de banho bem como a deposição de material orgânico em condições controladas e reduziu o tempo de busca e triagem de substâncias reproduzindo de maneira satisfatória as condições encontradas a campo. Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (0,17%v/v) e *Eucalyptus globolus* (0,41%v/v) e os taninos de *Acacia mearnsii* (15% m/v) não foram efetivos em controlar o crescimento bacteriano. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* (0,13% v/v) se mostrou efetivo em controlar a proliferação de microorganismos aeróbios mesófilos no líquido e na superfície dos cascos expostos ao tratamento. Quanto ao estojo córneo a capacidade de redução da aderência de biofilmes foi perdida quando da adição de matéria orgânica, sendo que nenhum dos tratamentos, nem mesmo o CP, foram superiores ao controle negativo (água). Tanto o CP, quanto o óleo de *Thymus vulgaris* afetam as células plânctônicas e não os biofilmes. Em vacas não foram observadas reações adversas locais quanto ao uso de *Thymus vulgaris* e *Acacia mearnsii* em pedilúvios de campo.

Palavras-chave: pedilúvio bovino, taninos, óleos essenciais.

ABSTRACT

Footbaths are basins installed in passageways of animals aiming treatment or prevention of foot diseases applying substances such as formalin, copper sulfate, or antibiotics to the digits surfaces. Facing high costs to fill foot baths with test-solutions, as well issues related to animal welfare and environmental contamination, the search for new methods of research is necessary for maximize the search process for new active ingredients able to reduce or eliminate use of potentially harmful compounds. The objective was to create a model for the development of new treatments to replace the current potentially harmful compounds. With this purpose, we developed a small-scale bench footbath model, VacaPed®. The model was used for the analysis of different solutions mixed to organic matter, the microbiologic development in the liquid and of biofilms upon the claw horn and possible local adverse reactions of the interdigital skin challenged with solution containing essential oils of *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globolus*, *Thymus vulgaris* and tannins from *Acacia mearnsii*. The solutions were applied in economically viable doses compared to formaldehyde and copper sulphate as positive control treatment (CP). The model is able to simulate the crossing of cattle in the bath solution as well as the deposition of organic matter under controlled conditions, reducing the time to search and screen substances reproducing in a satisfactory way the conditions found in the field. The essential oils *Melaleuca alternifolia* (0,17%v/v), *Eucalyptus globolus* (0,41%v/v) and tannins from *Acacia mearnsii* (15% w / v) failed in bacterial growth control. *Thymus vulgaris* essential oil (0.13% v / v) was effective in aerobic mesophilic proliferation control in the liquid and the surface of the claw horn exposed to the treatments. Considering the claw horn, the biofilm adhesion reduction capacity was lost when organic matter was added, and none of the treatments, not even the CP, were superior than the negative control (water). Both, CP and *Thymus vulgaris* essential oil, affect planktonic cells and not biofilms. In cows local adverse reactions with the use of *Thymus vulgaris* and *Acacia mearnsii* were not observed in a field footbath.

Key words: cattle footbath, tannins, essential oils

Lista de abreviaturas e siglas

DDB: Dermatite digital bovina

DI: Dermatite interdigital bovina

DIB: Dermatite interdigital bovina

FAO: Food and Agriculture Organization

HLB: Hemorragia de linha branca

HS: Hemorragia de sola

LAM: Laminite

SAE: Secretaria de Assuntos Estratégicos- Brasil

CuSO₄: Sulfato de cobre

TDS: Sólidos dissolvidos totais

m/V: milivolts

v/v: Diluição volume por volume- ml por ml

m/v: diluição de massa por volume- gramas por ml

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Capítulo 2):

Artigos publicados em periódicos científicos sobre pedilúvios bovinos e discriminação das substâncias, aplicações e resultados obtidos.....18

Tabela 1(Capítulo 3):

Valores observados em pedilúvio de campo para pH, TDS, Sal, Temperatura (°c), matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO). Médias de MS e MO que foram utilizadas para adição manual de fezes bovinas ao modelo de simulação de pedilúvio de bancada.....34

Tabela 2 (Capítulo 3):

Correlação de Spearman entre os valores simulados in vitro e encontrados no pedilúvio de campo.....38

Tabela 3 (Capítulo 3)

Comparação entre a eficácia dos tratamentos T3 e T4 frente aos controles positivo CP e negativo CN, na redução da aderência bacteriana à superfície do casco bovino em relação à elevação da concentração de matéria orgânica no líquido de banho sob simulação em pedilúvio de bancada.....40

Tabela 1(Capítulo 4):

Valores médios, mínimos e máximos dos preços de mercado para CuSO_4 em pó e Formaldeído líquido a 37 %.Valores correspondentes e doses economicamente equiparáveis de quatro substâncias antimicrobianas substitutas aos tratamentos com formaldeído e CuSO_453

Tabela 2 (Capítulo 4):

Comparação entre a eficácia dos tratamentos T3 e T4 frente aos controles CP e CN, na redução da aderência bacteriana a superfície do casco bovino em relação à elevação da concentração de matéria orgânica no líquido de banho. Simulação em pedilúvio de bancada.....59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1(Capítulo 3): Esquema de funcionamento do modelo de pedilúvio de bancada Vacaped®.....	37
Gráfico 1(Capítulo 3): Comparação do comportamento do TDS em pedilúvio de campo (F) e modelo de pedilúvio de bancada Vacaped® (V).	38
Gráfico 2 (Capítulo 3): Comparação do comportamento das concentrações de sal (%) em pedilúvio de campo (F) em comparação ao modelo de pedilúvio de bancada (V)	39
Gráfico 3 (Capítulo 3): Comportamento do pH entre as avaliações em pedilúvio de campo (F) e em modelo de bancada(V).....	39
Gráfico 4 (Capítulo 3): Média de unidades formadoras de colônia (UFC) em Log no líquido contido no VacaPed® após três repetições, para o tratamento controle positivo (CP) e controle negativo (CN).....	40
Figura 1 (Capítulo 4): Esquema de funcionamento do modelo de pedilúvio de bancada Vacaped®.....	52
Figura 2 (Capítulo 4): Vista em diagonal e frontal de pedilúvio dividido em duas porções na qual o lado direito continha o tratamento (T3 ou T4), o lado esquerdo continha o controle negativo CN.....	52
Gráfico 1 (Capítulo 4): Teste piloto em pedilúvio de bancada para comparação dos tratamentos T1 (<i>Melaleuca alternifolia</i>), T2 (<i>Eucalyptus globolus</i>), T3 (<i>Thymus vulgaris</i>) e T4 (taninos de <i>Acacia mearnsii</i>) com os CP e CN sobre a proliferação bacteriana, em Log UFC/ ml.....	55
Gráfico 2 (Capítulo 4): Valores de TDS para os tratamentos T3(<i>Thymus vulgaris</i>) e T4(taninos de <i>Acacia mearnsii</i>), em comparação com os controles.....	55
Gráfico 3: (Capítulo 4): Comparação da concentração de sal em% dos tratamentos T3 (<i>Thymus vulgaris</i>) e T4 (taninos de <i>Acacia mearnsii</i>) com os controles positivo (CP) e negativo (CN).....	56
Gráfico 4 (Capítulo 4): Comparação de pH entre ao controle negativo (CN), Positivo (CP), e o tratamento (T3) com <i>Thymus Vulgaris</i> e T4 com taninos de <i>Acacia mearnsii</i>	56

Gráfico 5 (Capítulo 4):

Valores médios de UFC, log transformadas, em tempos de simulação com 120(3,46% MO), 240(9,93% MO), 360(34,21% MO), 600(34,21% MO) e 900(34,21% MO) passagens para as três repetições em modelo de pedilúvio de bancada.....57

Gráfico 6 (Capítulo 4):

Média e desvio padrão da contagem total de microrganismos mesófilos em UFC crescidos sobre estojo córneo bovino de toda a simulação abrangendo 0 (0% MO) a 360 (34,21% MO).....58

Figura 2 (Capítulo 4):

Acompanhamento fotográfico antes, fotos acima, e depois (fotos abaixo) do membro posterior direito de um dos animais submetidos ao tratamento em pedilúvio a base de *Acacia mearnsii* 15%.....61

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.

A claudicação, as enfermidades podais, e as perdas econômicas a elas relacionadas são uma preocupação comum na bovinocultura mundial, pois representam a terceira maior fonte de problemas que podem causar o descarte e a perda de animais (Miller e Dorn, 1990; Blowey, 2003). A claudicação, além disto, piora os índices reprodutivos dos rebanhos, sendo que metade das vacas que claudicam não responde de maneira efetiva a protocolos de sincronização (Morris et al., 2011).

O Brasil notadamente vem evoluindo no cenário mundial do agronegócio, e no setor de produção animal não poderia ser diferente. Com uma produção robusta e expressiva, possuindo uma população de bovinos estimada em 200 milhões de animais, produzindo 36 bilhões de litros de leite por ano e cerca de 9 milhões de toneladas de carne (FAO, 2014; SAE, 2014). Neste cenário existe um mercado consumidor para produtos e serviços aberto ao emprego de novas tecnologias e soluções, tendo em vista o potencial expansivo da atividade ainda existente tomando por base que 70 milhões de hectares ainda são subutilizados (SAE, 2014).

Ao avaliar os prejuízos econômicos causados por doenças podais calculados a partir dos valores praticados no mercado norte americano Cha et al. (2010) concluíram que cada caso úlcera de sola (US) custou US\$ 216,07, dermatite digital (DDB) US\$ 132,96, e dermatite interdigital (DI) US\$ 120,70, sendo que a redução na produção de leite respondeu por 27 á 38 % dos custos, o valor do tratamento respondeu por 42% dos custos bem como a queda na fertilidade do rebanho que representou até 50 % dos custos. No Brasil encontramos todas as enfermidades podais descritas como as de causas mecânicas [úlceras de sola, úlcera de ponta de sola, desgaste excessivo, hematomas, doença da linha branca (DLB)], infecciosas [DDB, DI, e erosão de talão (ET)], toxicológicas (picadas de cobra), metabólicas [laminite (LAM) e fissuras] ou outras como hiperplasia interdigital, traumas e fraturas, pela ampla variedade de sistemas e locais de criação. As prevalências encontradas oscilam de 0,15% a 80,9% (1995; Molina et al., 1999; Souza et al., 2007; Tomasella et al., 2014). As doenças mais descritas na região sul do Brasil são DDB (29,9 %), US (18,3%), e DI (18,3%) (Cruz et al., 2001). Dentre as doenças anteriormente

citadas a DDB destaca-se por causar perdas econômicas e de bem-estar animal consideráveis (Hoffman, 2012). Lesões podais nas condições brasileiras devem ser tratadas *lege artis* o quanto antes, principalmente pela presença de moscas e suas larvas (Ollhoff & Debas, 2015).

Uma das formas de tratamento é através do uso de pedilúvios, que são recipientes geralmente instaladas em corredores de entrada ou saída da sala de ordenha. O estudo recente de Cook et al., (2012), que incluiu a análise de dados de 5 países espalhados pelo mundo demonstrou que não há padronização nas dimensões dos pedilúvios, o que pode dificultar a interpretação dos resultados dos diferentes estudos realizados com esta ferramenta. Os mesmos autores sugeriram algumas medidas para serem adotadas que maximizam e melhoram a aplicação de substâncias através de pedilúvios. O uso de pedilúvios para aplicação massal diminui os inconvenientes de mão de obra para o tratamento tópico das lesões (Laven & Logue, 2006) possibilitando por sua vez a aplicação em grande escala e de forma rotineira. A profilaxia, visando principalmente à redução do conteúdo de água da parede do casco, também é uma alternativa de uso do pedilúvio visto que o conteúdo de água nestas estruturas está diretamente relacionado com lesões podais tanto de origem mecânica, (US), e hemorragias de sola (HS), como infecciosas (ET) e também está relacionado com a severidade destas (Arkins et al., 1986; Borderas et al., 2004; Randhawa et al., 2008, Higuchi et al., 2009).

Geralmente usam-se como solução nos pedilúvios combinações de sulfato de cobre (CuSO_4) e formaldeído ou antibióticos (Grongnet et al., 1981; Holzhauser et al. 2012; Hoffman, 2012). Alguns tratamentos que eventualmente venham a substituir o CuSO_4 e o formaldeído estão sendo ou foram testados como, por exemplo, o uso de ácidos orgânicos (Smith et al., 2014), óleos essenciais (Smith et al., 2014), hipoclorito de sódio, sal e cloridrato de polihexametileno biguanida (Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2002; Silva et al., 2005;). Diante de um novo cenário de restrições e proibições por alguns países da União Europeia (European Commission, 2003a; European Commission, 2003b), e de planos nacionais de controles de resíduos e de despejo de efluentes, no Brasil (CONAMA, 2006), frente ao uso de antibióticos, metais pesados e formaldeído para o tratamento das afecções podais, se fazem necessárias novas pesquisas de princípios ativos capazes de sanar ou reduzir a utilização destes compostos potencialmente nocivos ao ambiente e a

saúde dos manipuladores e dos animais (Bergsten et al., 2006; Epperson & Midla, 2007; Holzhauer et al., 2012).

Tendo em vista a desuniformidade das dimensões dos pedilúvios espalhados pelo mundo, bem como a quantidade de substância a ser empregada para os tratamentos e posteriormente a ser descartada no ambiente é que se faz necessário a padronização dos meios de pesquisa. E também para que se possa avaliar de forma controlada as alterações físico-químicas das soluções de banho, bem como a efetividade dos tratamentos testados sobre o controle microbiológico tanto no líquido quanto na superfície do casco bovino, bem como outras aplicações que possam eventualmente suscitar dúvidas.

Para aprofundarmos os estudos sobre a aplicação e o uso de pedilúvio nas condições brasileiras, a presente dissertação objetivou criar um modelo de bancada para simular o uso de diferentes substâncias passíveis de aplicação em um pedilúvio bovino. Este modelo, uma vez criado, permitirá um menor uso de animais em testes a campo, um menor impacto ambiental e uma maior rapidez na triagem e nos testes de substâncias em potencial. O intuito final foi a partir dos testes *“in vitro”* obter substâncias com aptidão para serem usadas a campo, tanto com finalidades profiláticas quanto terapêuticas.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. Pedilúvios no Brasil e no Mundo.

Pedilúvios são amplamente utilizados o que se nota pela quantidade de artigos interessados em explorar o uso destes de maneiras preventivas ou profiláticas, bem como a busca por substâncias mais adequadas para serem empregadas. Na tabela 1 encontramos um resumo da literatura sobre o assunto no que tange as medidas dos pedilúvios, substâncias utilizadas, doenças em que são empregados e descrição breve dos resultados obtidos.

Tabela 1: Artigos publicados em periódicos científicos sobre pedilúvios bovinos e discriminação das substâncias, aplicações e resultados obtidos.

Autor	Substância	Controle Positivo	Período	Controle Negativo	Frequência de uso	Largura M comprimento M, profundidade M	Doença enfocada	PREV	TRAT	Resultado
Grongnet et al., 1981	Hipoclorito de sódio, iodóforos, CuSO ₄ , formaldeído, derivados fenólicos							Sim	Não	Fenóis e iodóforos com ação rápida e de curta duração sobre bactérias se comparado ao formaldeído e o CuSO ₄ . A associação de formaldeído 3% com CuSO ₄ 2% se mostrou mais eficiente do que as duas separadas.
Nowrouzian & Zareii, 1998	Lincomicina pedilúvio, 1,5 G por litro	Lincomicina spray		água	2 x ao dia por 1 semana		DDB	Não	Sim	Houve redução do escore de claudicação inicial e final dos grupos tratados com lincomicina (pedilúvio e spray), sendo estes mais pronunciados no grupo que recebeu o spray do medicamento, via tópica
Shearer & Hernandez, 2000	Cu solúvel + peróxidos e agente catiônico	Oxitetraciclina, Composto com doses reduzidas de Cu e peróxidos e aumentadas de agente catiônico, Composto com doses reduzidas de peróxidos.	28 dias		1 x ao dia em esquema variável		DDB	Não	Sim	O tratamento com doses reduzidas de peróxidos se mostrou o mais efetivo, a oxitetraciclina apresentou baixos níveis de eficácia o que pode estar relacionado a resistência bacteriana.
Cunha et al., 2001	Polihexametileno biguanida (1%; 3% e 5%).		7 dias			0,75 3 0,4	-	Sim	Não	Concentração de 1% considerada a melhor (bacteriostática)
Cunha et al., 2002	CaI 5%%, CuSO ₄ 5%, biguanida 1,3 e 5% Zn 5%				1x ao dia/ 2 dias	0,75 3 0,4	-	Sim	Não	Indicou o uso de soluções de CuSO ₄ 5% ou Biguanida 1% (viabilidade comercial)
Laven & Hunt, 2002	Formaldeído 6%%, CuSO ₄ O4 2%, ácido per acético 1%	Eritromicina 0,21%/ 1 x ao dia por 2 dias	7 dias		1 x ao dia	- 3 -	DDB.	Não	Sim	Redução das lesões em todos os grupos
Manske et al., 2002	CuSO ₄ ionizado 0,6%%	Glutaraldeído 1:50 bandagem Oxitetraciclina 100 mg/ml- bandagem	47 dias	Casqueament o preventivo, água para o tratamento que usou pedilúvio	2x ao dia, em intervalos variáveis		DDB, ET, HS, HLB, LAM	Sim	Sim	O estudo concluiu que o uso tópico de glutaraldeído não é mais eficiente do que apenas o casqueamento na cura da DDB, as duas aplicações de oxitetraciclina se mostraram aditivas ao casqueamento, aumentando a cura clínica, o tratamento com CuSO ₄ em pedilúvio se mostrou uma forma efetiva de tratamento

Bergsten et al., 2006	Ácido per acético	CuSO ₄ 7%	16 semanas			Colchão	ET, DDB, Hiperplasia, DI.	Sim	Não	CuSO ₄ 2 x/ dia reduz riscos de ET e DDB.
Stachurski & Lancelot, 2006	Piretróides 0,004-0,005%		3 anos/	Variável		0,56/0,48 3,5 0,4	Carrapatos	Sim	Não	Reduziu a taxa de infestação por <i>Amblyomma variegatum</i>
Bouyer et al. 2007	Alfa cipermetrina 0,005%	Cipermetrina spray	34 dias	Variável		0,5 3,3 0,4	Moscas tsé-tsé	Sim	Não	Redução da população de moscas.
Silva et al., 2007	Hipoclorito de sódio 2 e 4%	0	5 dias	0	1 vez dia 3 minutos de imersão	0,75 3 0,4	-	Sim	Não	Soluções a 2% e a 4% com resultados semelhantes no controle microbiológico. Troca das soluções a cada 48 horas com 40 passagens de animais.
Thomsen et al., 2008	1% ácido acético e per acético + peróxido de hidrogênio 1,5% Glutaraldeído Quaternário de amônia 2%		8 semanas	água		- 2,3 0,2	DDB.	Sim	Sim	Produtos não efetivos para a DDB
Leão et al., 2008	CuSO ₄ a 3% intercalado com hipoclorito a 1%			água			DDB	Não	Sim	Bovinos com tratamento cirúrgico + antibioticoterapia e passagem nas soluções de Cu por uma semana intercaladas com hipoclorito se recuperaram melhor
Bouyer et al., 2009	Deltametrina 0,005%		~ 50 dias	Sem tratamento			Moscas tsé-tsé	Sim	Não	Redução na incidência de tripanossomose e manutenção de parâmetros da crase sanguínea.
Speijers et al., 2010	10% NaCl, 2% hipoclorito de sódio, 5 e 2% de CuSO ₄			Sem Tratamento			DDB.	Sim	Sim	NaCl intercalado com CuSO ₄ 04 uma semana de cada, só apresenta algum benefício quando as prevalências de lesões de DDB são baixas.
Speijers et al 2010	2% hipoclorito de sódio			Sem Tratamento			DDB.	Sim	Sim	O hipoclorito sozinho não foi recomendado, e o CuSO ₄ nas concentrações de 2 a 5% é efetivo no tratamento, porém não na prevenção/ rebanhos mais afetados passagem pela solução de Cu ao menos 2 x / dia.
Teixeira et al 2010	Dragonhide 5%	CuSO ₄ 10% Formalina 5%	4 semanas	-	2 x por semana	1 1,5 0,1	DDB.	Sim	Sim	Diferentes tratamentos não demonstraram ser efetivos na prevenção ou tratamento de lesões de DDB
Laven & Proven 2011	Eritromicina 35 mg/l		1 dia/ 2 ordenhas	-	2 x ao dia		DDB.	Não	Sim	Eritromicina é efetiva e sem efeitos adversos,
Holzhauser et al 2012	CuSO ₄ acidificado,	Formaldeído 4%	4 meses	-	2 x dia 5 dias semana	0,64 2,33 0,18	DDB.	Sim	Sim	CuSO ₄ acidificado 3 x melhor que o formaldeído em prevenir a DDB, porém não superior a clortetraciclina.

Logue et al 2012	Substância com baixa concentração de cobre	CuSO ₄ 5%	103 dias	-	2 x ao dia 3 dias por semana	0,95 2,2 x2 0,36	DDB.	Sim	Sim	Reduziu a prevalência de DDB e a gravidade das lesões.	
Holzhauser et al 2012	Feet care 2%, multicomposto, carbonato de sódio	Formaldeído 4%	6 meses	-		0,8 3 0,15	DDB.	Sim	Sim	Formaldeído a 4% é o melhor na redução da severidade de lesões de DDB, carbonato não foi efetivo em reduzir a taxa de novas infecções.	
Döpfer et al 2013	Thymox 1%	CuSO ₄ 5%			3 x na semana 1 x ao dia		DDB	Não	Sim	O grupo tratado com Thymox 1% apresentou resultados semelhantes ao grupo tratado com CuSO ₄ 5%, tanto na redução de formas crônicas quanto no número de animais sem lesões no rebanho. A MIC contra <i>Treponema</i> ficou em 0,004% de Thymox com 20% de esterco bovino.	
Ndeledje et al 2013	Deltametrina 0,005%	-	6 meses	-	Variável	1 3,5 0,4	Moscas tsé-tsé	Sim	Não	Redução de 80% da população de moscas em 6 meses de tratamento	
Fjeldas et al 2014	Água CuSO ₄ 7% Lavagem automática com água+ glutaraldeído	CuSO ₄ 7%	7 meses	Sem tratamento	A cada segunda semana	0,74 2,73 0,15-0,22	DI, ET,	Sim	Não	CuSO ₄ previne ET e DI, os cascos bovinos submetidos ao CuSO ₄	
Smith et al 2014	Provita Hoofsure 3%- Tea Tree oil	CuSO ₄ 5%	104 dias	-	1 x ao dia por 5 dias	0,65 2,33	DDB.	Sim	Sim	O produto comercial a base de óleo de <i>Melaleuca</i> se mostrou similar ao CuSO ₄	
Silva et al 2015	Estratos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> 10%		45 dias	Água e limpeza física		0,8 3 0.1	DDB	Não	Sim	A aplicação do <i>Stryphnodendron adstringens</i> melhorou os índices de cura de feridas pós-cirúrgicas de DDB / troca com 270 passagens.	
Total	Conclusões gerais						conclusão				

26 trabalhos

Períodos avaliados de 1 dia a 7 meses

Frequência de passagem de animais variável entre tratamentos

Dimensões do pedilúvio variáveis

9 doenças abordadas

Maioria dos tratamentos a base de CuSO₄ ou formaldeído, ~ 46% dos autores recomendou CuSO₄ em alguma forma de aplicação. ~ 31% dos artigos sugeriram outros possíveis tratamentos equiparáveis ao CuSO₄ e formaldeído, sendo que aproximadamente a metade destes 15,4%, se referiu a tratamentos de DDB, com ou sem debridamento cirúrgico. 11,5% fizeram avaliações microbiológicas não avaliando doenças específicas.

OBS.: Medidas de largura, comprimento e profundidade em M: metros, DDB: dermatite digital bovina, DI: dermatite interdigital, ET: Erosão de talão, HS: hemorragia de sola, HLB: hemorragia da linha branca, LAM: laminite. PREV: uso preventivo; TRAT: uso para tratamento.

A DDB foi incluída nas investigações de aproximadamente metade dos autores avaliados. Dos trabalhos analisados, 19% buscaram uma abordagem mais ampla considerando o controle da proliferação bacteriana como importante para a validação ou busca de substâncias a serem utilizadas. O aspecto mais profilático do que terapêutico foi abordado por 35% dos artigos, ao passo que outros 35 % abordaram ambos ao mesmo tempo e 27% abordam apenas o aspecto terapêutico. Encontramos também quatro trabalhos brasileiros, oriundos de uma mesma universidade, que compararam substâncias e seus possíveis efeitos microbicidas. Foram avaliados também protocolos terapêuticos e pós-cirúrgicos bem como possíveis reações adversas (Cunha et al. 2001; Cunha et al., 2002; Silva et al., 2005; Silva et al., 2007, Silva et al., 2015). Como resultado tivemos a maioria dos tratamentos a base de CuSO_4 ou formaldeído, cerca de 46% dos autores recomendaram CuSO_4 em alguma forma de aplicação, 31% dos artigos sugeriram outros possíveis tratamentos equiparáveis ao CuSO_4 e formaldeído, sendo que aproximadamente a metade destes (15,4%) se referiu a tratamentos de DDB, com ou sem debridamento cirúrgico. Uma pequena parte dos trabalhos (11,5%) fizeram avaliações microbiológicas não avaliando em doenças específicas. Também é usado especificamente para doenças de cunho infeccioso como a DID, a DDB e a ET (Bergsten et al., 2006; Fjeldas et al., 2014).

Foi citado o uso no controle de carrapatos *Amblyomma variegatum* (Stachurski & Lancelot 2006), no controle de moscas *tsé-tsé* e conseqüentemente no controle de algumas doenças por elas transmitidas a homens e animais (Bouyer et al., 2007; Bouyer et al., 2009; Ndeledje et al., 2013).

O que se pode ver em linhas gerais é uma ampla variação de medidas e dimensões destes pedilúvios, com diversas substâncias testadas e grande variação nas frequências de uso. O que corrobora os achados de Cook et al., (2012).

2.1.1. Pedilúvios usados profilaticamente.

Como citado anteriormente grande parte dos trabalhos enfocam os usos profiláticos de pedilúvios na espécie bovina (Tabela 1), sendo que grande parte deles aborda simultaneamente aspectos tanto de prevenção quanto de tratamento de doenças podais, marcadamente a DDB.

Arkins et al., (1984) demonstraram que o uso de formaldeído pode estar relacionado a menores quantidades de água na região da parede e da sola dos cascos, e que dígitos não tratados com a substância tiveram maiores teores de umidade diretamente relacionada com doenças mecânicas como hemorragias de sola, na região central e região típica de ulceração. Quando associada ao casqueamento preventivo, o uso de formaldeído se mostrou efetivo em reduzir as chances de ocorrência de (HS), (HLB), aparecimento de sola dupla, e o supercrescimento do casco (Randhawa et al., 2014).

Thomsen et al., (2008), não observaram efetividade de nenhuma das substâncias por eles testadas [composto comercial ácido acético + per acético+ peróxido de hidrogênio (1%), composto comercial contendo glutaraldeído (1,5%), e composto comercial contendo quaternário de amônia (2%)] em comparação ao não tratamento das lesões de DDB e concluíram que a contaminação fecal da solução de banho, bem como o não tratamento de um dos membros dos animais pode ter contribuído para o aumento da carga microbiana, e conseqüentemente subestimado o efeito dos tratamentos. Speijers et al., (2010), concluíram que o uso apenas de hipoclorito de sódio (2%) não foi eficiente contra a DDB e que o CuSO_4 (5%) se mostrou efetivo no tratamento desta não prevenindo novas infecções e que por isso o uso semanal por pelo menos 4 ordenhas na semana seria o mais recomendado, em detrimento de tratamentos quinzenais e com menores concentrações de CuSO_4 . Teixeira et al., (2010) não observaram efeito na probabilidade de cura de lesões de DDB, nem efeitos superiores do produto comercial denominado de Dragonhyde®, a base de fenoxietanol, frente ao formaldeído. Holzhauer et al., (2012) observaram que o CuSO_4 acidificado teve eficácia equivalente à clortetraciclina em prevenir novas lesões de DDB, sendo seu efeito superior ao tratamento com formaldeído.

Produtos contendo menores concentrações de cobre foram capazes de reduzir a prevalência de DDB e a gravidade das lesões, sendo este efeito maior de acordo com o comprimento do pedilúvio, demonstrando o efeito do número e tempo de imersão do casco na solução de banho sobre a eficiência do tratamento (Logue et al., 2012).

Ainda em busca de produtos menos lesivos ao ambiente, Smith et al., (2014), testaram um produto comercial a base de óleo essencial de *Melaleuca* e concluíram que o mesmo pode ter eficácia similar ao CuSO_4 podendo ser viabilizado para uso

frequente. Holzhauser et al., (2012) ao testarem diversas substâncias concluíram que nenhum dos produtos testados foi superior ao formaldeído em prevenir ou reduzir a severidade das lesões de DDB, os tratamentos que incluíram apenas a passagem pelo pedilúvio preenchido com solução comercial multicomposta ou com carbonato de sódio 3% foram ineficientes em reduzir os casos de DDB, ocorrendo inclusive um aumento na prevalência da doença o que foi atribuído a uma desinfecção subótima dos espaços interdigitais. No mesmo sentido o alastramento de casos de DDB em rebanhos sem histórico da doença em que animais portadores foram inseridos foi maior em rebanhos que utilizavam pedilúvios do que os que não o utilizavam regularmente, sendo da mesma forma superiores em rebanhos que utilizavam apenas CuSO_4 ou ácidos orgânicos, em detrimento dos rebanhos que utilizavam formaldeído demonstrando que uma desinfecção adequada do espaço interdigital deve ser feita (Nowrouzian et al., 2002; Zemljic, 2004).

No geral o que se encontrou foi a falta de unanimidade sobre eventuais substâncias que possam se equiparar ou substituir o formaldeído e o CuSO_4 , os quais parecem apresentar eficácia superior na prevenção de algumas doenças podais em comparação com os outros produtos testados. Há poucas informações sobre a estabilidade destas substâncias frente às condições encontradas no pedilúvio como a quantidade de matéria orgânica e as alterações provocadas pela passagem dos bovinos.

2.1.2. Pedilúvios usados terapeuticamente.

Os trabalhos que abrangem as doenças de origem mecânica como, hemorragias de sola e de linha branca, presença de sola dupla, avulsão de sola e supercrescimento, abordam o uso de pedilúvios com um aspecto muito mais preventivo do que curativo, sendo no geral associados ao casqueamento corretivo regular destes animais (Arkins et al., 1984; Randhawa et al., 2014). Os relatos de uso terapêutico nas doenças de cunho infeccioso (DI e ET) e infectocontagioso (DDB) são muito mais frequentes como observado na tabela 1.

O uso terapêutico de soluções contendo sulfato de cobre, formaldeído, eritromicina, hipoclorito de sódio e oxitetraciclina se mostraram efetivos, na DDB. (Shearer & Hernandez, 2000; Laven & Hunt, 2002; Manske et al., 2002; Laven & Proven 2011). Com exceção do hipoclorito de sódio que demonstrou resultados

conflitantes (Speijers et al., 2010). Quanto ao uso terapêutico de pedilúvios na DDB, Laven e Hunt (2002) observaram que tanto o formaldeído quanto a eritromicina foram capazes de reduzir as lesões causadas pela DDB (Laven & Proven, 2011).

Como a maioria dos artigos aborda o uso simultâneo tanto profilático quanto terapêutico e a quase totalidade dos rebanhos encontra-se com a presença de um variado leque de doenças podais, podemos observar que mesmo as aplicações sendo consideradas profiláticas, possuem no seu uso em rebanhos, um aspecto que pode mais apropriadamente ser visto como metafilático, pois se aplicam fármacos em um processo em curso (Dirksen et al., 1993). Dificuldades são encontradas na avaliação do processo de cura, ocorrendo desuniformidade nos critérios, sendo lesões muitas vezes avaliadas por inspeção em membros sujos na sala de ordenha e sem se levantar o membro (Holzhauer et al., 2012).

O pedilúvio a base de hipoclorito de sódio usado sobre lesões crônicas proliferativas (DDB) parecem não surtir efeito, sendo associado seu uso a remoção cirúrgica prévia das lesões (Leão et al., 2008; Silva et al., 2015). Segundo Laven & Proven, (2011) melhores efeitos terapêuticos são obtidos utilizando antibióticos no pedilúvio, principalmente no tratamento da DDB, porém Laven & Hunt, (2002); Shearer et al., (2000) e Leão et al., (2008) relataram bons resultados também usando o CuSO_4 , bem como alguns trabalhos demonstram bons resultados, mesmo terapêuticos, com o formaldeído (Laven & Hunt, 2002; Holzhauer et al., 2012).

Concluindo pode se afirmar que, considerando-se os custos das substâncias, facilidade de acesso e aplicação das formulações, e o volume de trabalhos científicos realizados sobre eles, o CuSO_4 e o formaldeído, seriam as soluções de escolha. Com custos aparentemente mais elevados os antibióticos (eritromicina, clortetraciclina e oxitetraciclina) seriam a opção de escolha para uso em pedilúvio em doenças de conotação infecciosa onde os produtos habituais não possam ser empregados, lembrando é claro a possibilidade de falhas nestes tratamentos devido a questões relacionadas à de resistência bacteriana e as condições de higiene do meio (Shearer & Hernandez, 2000; Nuss, 2006).

2.2. Principais substâncias usadas em pedilúvios.

Uma ampla gama de substâncias foi testada em pedilúvios e podem ser encontradas na tabela 1. Elas incluem o hipoclorito de sódio, carbonato de sódio,

óleos essenciais, NaCl, ácido acético, per acético, peróxido de hidrogênio, sulfato de Zn, glutaraldeído, quaternário de amônia, cal, polihexametileno biguanida, ácido tartárico, molibdato de sódio, compostos fenólicos, iodóforos, estratos de *Stryphnodendron adstringens* e formulações comerciais.

No geral o que se encontra é a falta de unanimidade sobre eventuais substâncias que possam se equiparar ou substituir o formaldeído e o CuSO₄, e poucas informações sobre a estabilidade destas substâncias frente às condições encontradas no pedilúvio como a quantidade de matéria orgânica e as alterações provocadas pela passagem de animais.

2.2.1 Sulfato de cobre e formaldeído.

O uso destas duas substâncias de forma conjunta ou separada é algo amplamente relatado em literatura (vide tabela 1). O conteúdo dos pedilúvios é descartado junto com o chorume, proveniente do acúmulo de esterco nas instalações dos animais, sendo utilizados geralmente para a fertilização de algumas culturas de Gramíneas e leguminosas, podendo carrear altas doses de cobre e zinco aos solos (Konzen, 1999; Petersen et al., 2007).

O cobre pode se depositar de maneira acumulativa, levando a perdas em algumas culturas agrícolas, danos a microbiota do solo, redução da reciclagem de elementos, e danos a sistemas aquáticos como alterações nas populações de algas e morte de peixes (Hanson & Stefan, 1984; Flemming & Trevors, 1989; Hee et al., 2005; Epperson & Midla, 2007). Os métodos tradicionais de estocagem e estabilização do esterco bovino não são capazes de reduzir a contaminação com metais pesados, pelo contrário, a perda de material carbonado pela estabilização pode adensar ainda mais o conteúdo destes metais (Petersen et al., 2007). Estima-se que 40% do Cu que são depositados anualmente em solos agrícolas, na Inglaterra, seja proveniente do descarte de chorume animal, sendo grande parte destes devido aos bovinos (Nicholson et al., 2006). O problema é tão grande que legislação específica (reduzindo os limites máximos de adição de Cu a dieta de animais), foi aprovada para a União Européia – UE (European Commission, 2003a; European Commission, 2003b), ao passo que a resolução n° 379 de 29 de agosto de 2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA estabelece, no Brasil,

os limites máximos de Cu que lodos destinados à fertilização devem conter, além de dar diretrizes às cargas máximas do elemento que podem ser aplicadas aos solos.

Com uma deposição contínua de cobre ao solo, o mesmo pode ficar saturado do elemento em um espaço de 5 a 30 anos (Epperson & Midla, 2007). Os requerimentos de algumas culturas agrícolas giram em torno de 550 g por hectare, ao passo que a deposição, dependendo do regime de despejo deste efluente, pode chegar a aproximadamente 4,5 kg por hectare, o que pode reduzir o crescimento radicular de algumas Gramíneas (Filis et al. 2006), a exceção do milho que é mais tolerante a grandes doses de cobre (Filis et al., 2006).

O formaldeído por sua vez pode ser lesivo aos seus manipuladores sendo potencialmente carcinogênico, causando efeitos reprodutivos deletérios podendo atravessar a barreira placentária e causar alterações fetais, e reprodutivas em machos (Kerns et al., 1983; Trasher & Kilburn, 2001; Epperson & Midla 2007). As concentrações de formaldeído no líquido de banho podem cair a taxas de 50% da concentração inicial em um espaço de tempo aproximado de 2.4 dias, oscilando este valor entre 300 e 320 passagens de animais pela solução de banho, e que pode variar de acordo com a temperatura ambiente, pois um incremento desta poderá aumentar a taxa de evaporação do formaldeído (Holzhauer et al., 2004). Portanto a ventilação, a presença de matéria orgânica e o sistema de manejo dos animais podem contribuir grandemente com a mitigação dos riscos relacionados ao formaldeído, o que pode ser um fator de escolha do deste em detrimento do CuSO_4 (Meinelt et al., 2004, Doane & Sarenbo, 2014).

Os dados sobre o impacto do formaldeído em populações humanas e populações de risco ainda são conflitantes, sendo que geralmente são relatados casos de irritação, alergias, náusea vômito, perda de memória, dores de cabeça além do potencial carcinogênico (Acheson et al., 1984). Em relação aos animais já foram relatados casos de queimaduras de pele associados ao uso de formaldeído a 5% em pedilúvio (Dyson et al., 2013), e morte por ingestão da solução de formaldeído que causou acentuada necrose rumenal e esofágica (Blowey, 2013). Quanto aos mecanismos de ação destas substâncias, o formaldeído reage com grupamentos amínicos, carboxílicos e sulfidrilas em enzimas e outras proteínas, e o Cu^{++} reage com grupamentos thiol na superfície bacteriana, ambos alteram as funções destas proteínas levando a morte bacteriana (Russel, 2003; Epperson &

Midla, 2007). Por conta destes mecanismos, o formaldeído é utilizado como bactericida, virucida e fungicida há décadas na medicina veterinária (Steiger, 1986).

O formaldeído frequentemente é empregado em pedilúvios sendo relatadas melhoras ou reduções nos índices de prevalência de algumas doenças como a doença da linha branca, erosão de talão, hemorragias de sola, sola dupla e redução do supercrescimento do casco (Arkins et al., 1986; Randhawa et al., 2008). Estes estariam associados ao poder antisséptico da substância, bem como a alterações das propriedades físicas do casco pelas mudanças na estrutura da queratina, que o compõe (Arkins et al., 1986; Borderas et al., 2004; Gregory, 2004; Randhawa et al., 2008, Higuchi et al., 2009,). Foram demonstrados efeitos do formaldeído sobre a redução dos efeitos, da ureia e sulfitos sobre a estrutura, e conseqüentemente a rigidez de cascos expostos ao chorume (Gregory, 2004). Grongnet et al., (1981) demonstraram, que a associação de formaldeído 3% com 2% de CuSO_4 , teria poder antisséptico superior aos elementos isoladamente, mantendo a contagem bacteriana na solução até 900 passagens em um pedilúvio de 600 litros de solução.

Parece haver uma maior efetividade do CuSO_4 em concentrações de 5 a 7 % sobre o controle e redução das taxas de prevalência de dermatite digital bovina (Bergsten et al., 2006; Logue et al., 2012). O que vai de encontro a um uso de soluções mais concentradas no pedilúvio, aumentando assim o impacto que o descarte destas soluções após uso representa sobre o ambiente, isto somado aos efeitos deletérios do formaldeído justifica o esforço por se buscar substâncias alternativas a estas.

2.2.2. Uso de protocolos terapêuticos envolvendo antibióticos topicamente aplicados, de forma isolada ou associada, para tratamento de doenças podais.

Laven e Hunt 2002 observaram que tanto o formaldeído quanto a eritromicina (0,21%) foram capazes de reduzir as lesões causadas pela DDB. Em outra observação a eritromicina (35 mg/l) se mostrou efetiva no tratamento da DDB (Laven & Proven, 2011) bem como a lincomicina 1,5 g por litro aplicada via pedilúvios reduziu o escore de claudicação inicial e final dos grupos tratados (Nowrouzian & Zarrei, 1998). Laven e Logue (2006) demonstraram em sua revisão sobre o assunto que existem contradições quanto ao uso parenteral de antibióticos contra a dermatite digital bovina, e que por isso as estratégias de uso tópico, incluindo spray e

pedilúvio, seriam mais apropriadas reduzindo inclusive os custos com descarte de leite em respeito ao período de carência de antibióticos. Tais estratégias podem ser variadas, incluindo além dos pedilúvios bandagens com aplicação de oxitetraciclina e apenas o uso tópico de spray do medicamento (Laven & Logue, 2006). Diferentes protocolos terapêuticos são empregados e Holzhauser et al., (2012) em comparação do uso de formaldeído a 4%, com cobre acidificado, e Clortetraciclina tópica, concluiu que o tratamento incluindo o cobre foi mais efetivo em prevenir a dermatite digital, porém não demonstrou ser mais efetivo do que o uso de clortetraciclina tópica para o tratamento da lesão.

Na natureza as moléculas de alguns destes antibióticos, como a clortetraciclina, podem se depositar em solos e em água, podendo, dependendo da estrutura química do solo e do antibiótico, ter efeito direto sobre a flora bacteriana residente atuando assim sobre a seleção de bactérias resistentes e genes de resistência a antibióticos (Kemper, 2008; Aust et al., 2008), embora tais efeitos ainda precisem ser melhor elucidados (Aust et al., 2008).

Finalmente o uso indiscriminado de antibióticos não substitui melhoras no manejo, ainda que possa ser empregado em casos emergenciais, uma vez que a falta de cuidados como os de higiene pode ser um grande fator de precipitação e perpetuação de doenças podais (Nuss, 2006).

2.2.3. Outras substâncias que foram, ou que podem vir a serem testadas e utilizadas em pedilúvios.

Grongnet et al., (1981) testaram o hipoclorito de sódio, iodóforos e derivados fenólicos e concluíram que todos eram ineficientes em modular a proliferação bacteriana mantendo contagens que variavam de log de 10^4 a 10^6 de acordo com o número de passagem de animais pela solução de banho. Cunha et al, (2001 e 2002) avaliaram o polihexametileno biguanida como solução desinfetante para ser usada em pedilúvios e concluíram que tanto a concentração de 1% quanto a concentração de 5% eram eficientes em manter baixas as contagens bacterianas (<200 UFC/ ml de mesófilos) na solução, muito próximas das contagens obtidas com o CuSO_4 e o formaldeído, se mostrando melhor do que a cal a 5% (Cunha et al., 2002). O hipoclorito de sódio a 1% se mostrou efetivo no controle microbiológico, porém muito pouco estável e volátil perdendo seu conteúdo em cloro e tendo de ser totalmente

trocado a cada 48 horas (Silva et al., 2005). O hipoclorito de sódio na concentração de 2% não se mostrou superior ao CuSO_4 no controle da DDB (Speijers et al., 2010). Também foram investigados os efeitos da solução de NaCl a 10% sobre a DDB, e concluiu-se que esta só apresenta algum efeito quando realizada de forma intercalada com o CuSO_4 e em baixas prevalências da doença (Speijers et al., 2010). Thomsen et al., (2008) avaliaram a eficiência do glutaraldeído, de soluções comerciais [composto comercial ácido acético + per acético+ peróxido de hidrogênio (1%), composto comercial contendo glutaraldeído (1,5%), e composto comercial contendo quaternário de amônia (2%)] e concluíram que não houve melhora nas taxas de cura e nem de prevenção da DDB. Teixeira et al., (2010) avaliando outro produto comercial chegaram às mesmas conclusões, sendo que o produto por eles testado não se apresentou melhor do que o formaldeído. O formaldeído a 4% também se mostrou superior ao carbonato de sódio na modulação da DDB (Holzhauer et al., 2012).

Smith et al., (2014) testando um produto a base de óleo essencial de *Melaleuca* encontrou efeitos semelhantes ao CuSO_4 , podendo este ser um eventual substituto ao mesmo. Kulow et al., (2015) em trabalho com cepas de microrganismos envolvidos em infecções e doenças podais como *Campylobacter* sp, *Dichelobacter* sp, *Fusobacterium* sp, *Porphyromonas* sp, *Prevotella* sp e *Treponema* sp utilizando produto comercial a base de óleo essencial de tomilho denominado Thymox (Timol 0,23%) encontraram doses inibitórias destes produtos abaixo da recomendada pelo fabricante, cerca de 0,1% contra 1%, o que segundo eles demonstra a capacidade do produto em eventualmente substituir o CuSO_4 a 5%. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* demonstrou também ser efetivo no controle biofilmes (bactérias embebidas em matriz proteica e polissacarídica, de forma a aumentar sua resistência a antibióticos, as defesas do hospedeiro e ao meio possibilitando a cronificação de doenças) de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* nas doses que variaram de 0,25 á 2% v/v (Shuneigat et al., 2014).

Outras substâncias apresentam potencial antisséptico como, por exemplo, os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia*, e taninos derivados da *Acacia mearnsii* (Haslan, 1996; Carson et al. 2006; Tohidipur et al., 2010, Smith et al., 2014), e podem ser avaliadas como eventuais substitutos aos tratamentos

convencionais. Os taninos apresentam a capacidade de complexação de metais (Fe, Cu, Al e Ca), complexação de proteínas e polissacarídeos e a formação de uma espécie de película que gera um ambiente no qual o processo de cicatrização é beneficiado e a atividade antibacteriana é evidenciada (Haslan, 1996; Smith et al., 2003). Foram atribuídos a taninos efeitos benéficos encontrados quando da aplicação em pedilúvio de extratos glicólicos de *Stryphnodendron adstringens* (Silva et al., 2015).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana, apresentando concentrações inibitórias mínimas de 0,25 % a 0,5 % para *E. coli*, e *S. aureus* e *Cândida albicans*, e de 0.016% a 1% para outras cepas bacterianas (Mann et al., 2000; Carson et al., 2006). Nestas concentrações mínimas inibitórias ocorreram alterações da estrutura de membrana com aumento da permeabilidade, e extravasamento de conteúdo intracelular (Carson et al., 2006). Este óleo essencial, em uso tópico, apresenta também a capacidade de modulação da atividade imunológica (Brand et al., 2002, Abe et al., 2003, Caldefie et al., 2004).

Estudos demonstraram alguma efetividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* contra cepas de estafilococos resistentes a metilina (Tohidipur et al., 2010; Mulyaningsih et al., 2011). Atividade imunomodulatória foi atribuída ao 1-8 cineol (Juergens et al., 1998; Juergens et al., 1998b; Vigo et al., 2004; Serafino et al., 2008).

Alguns destes compostos foram testados em modelo experimental de pedilúvio de bancada e se encontram nos próximos capítulos.

CAPÍTULO 3

Desenvolvimento de um modelo de pedilúvio de bancada Vacaped[®]

A R B Debas; M V Pissaia L Chagas; A Wozniak, V Klein Jr, R D Ollhoff.

Frente aos custos elevados no uso de pedilúvios com soluções teste, bem como a questões relacionadas ao bem-estar animal e contaminação ambiental, novas metodologias de pesquisa com pedilúvios são necessárias. Objetivou-se criar um modelo para o desenvolvimento de novos tratamentos capazes de serem aplicados a campo para substituir o uso atual de compostos potencialmente nocivos. O objetivo foi desenvolver um protótipo de pedilúvio de laboratório semiautomático (VacaPed[®]), que nos permite simular as passagens dos animais, verificar a proliferação bacteriana e reduzir custos das buscas por novas substâncias. A matéria orgânica que entra no sistema foi estipulada a partir de observações feitas em pedilúvio de campo. As mensurações do líquido contido no pedilúvio incluíram sólidos dissolvidos totais, pH e sais, realizadas com aparelho portátil PCE-PHD1[®]. A movimentação do líquido no VacaPed[®] foi obtida através de um servo motor TRAXXAS 2018[®], acoplado a duas hastes contendo um estojo córneo bovino em sua extremidade. Utilizou-se para simulação tanto uma solução somente com água quanto com CuSO₄ (2%) e formaldeído (3%). Avaliaram-se no líquido do VacaPed[®] além dos parâmetros físico-químicos, o crescimento bacteriano através da cultura de aeróbios mesófilos. Biofilmes formados sobre fragmentos de estojo córneo bovino imersos no líquido do VacaPed[®] foram mensurados. O volume calculado de matéria orgânica adicionada foi de 3,46%, para 120 passagens, 9,93% para 240 passagens e 34,21% para 360 passagens. Tanto a água como o CuSO₄ (2%) com formaldeído (3%) reduziram as populações bacterianas aderidas à parede dos cascos. Este é o primeiro relato da construção de um modelo automatizado para a simulação de um pedilúvio sendo capaz de simular as alterações químicas e microbiológicas que ocorreram no pedilúvio a campo. O modelo VacaPed[®] poderá ser empregado para acelerar o processo de busca por novas substâncias a serem utilizadas em pedilúvios para bovinos.

Palavras chave: Simulador de pedilúvio, triagem de produtos, bovinos.

Introdução:

Pedilúvios são recipientes instalados na entrada ou saídas, principalmente de salas de ordenha, destinadas à aplicação de substâncias desinfetantes ou antibióticas aos pés de bovinos. Geralmente são pouco padronizados ocorrendo uma grande variação nas suas medidas pelo mundo (Cook et al., 2012; Hoffman, 2012). Há vários relatos de seu emprego de maneira profilática ou terapêutica em

diversas doenças como a dermatite digital bovina, dermatite interdigital, erosão de talão, controle de moscas *tsé tsé* e carrapatos *Amblyomma variegatum* na África (Bergsten et al., 2006; Bouyer et al., 2007, Bouyer et al., 2009, Hoffman, 2012; Ndeledje et al., 2013, Fjeldas et al., 2014).

O sulfato de cobre e formaldeído são amplamente utilizados em pedilúvios com fins terapêuticos ou profiláticos (Hoffman, 2012). Levando em conta os impactos ambientais, o CuSO_4 pode gerar consideráveis danos a sistemas agrícolas, a microbiota do solo e a sistemas aquáticos (Hanson & Stefan, 1984; Flemming & Trevors, 1989; Hee et al. 2005; Epperson & Midla, 2007). Enquanto o formaldeído apresenta potencial nocivo que pode levar a carcinogênese, efeitos reprodutivos deletérios, alterações fetais e contaminação do leite, sendo necessárias alternativas ao uso destes elementos (Kerns et al., 1983; Trasher & Kilburn, 2001; Epperson e Midla, 2007).

O uso de tratamento massal proporcionado pelo pedilúvio é necessário principalmente para atender a uma demanda cada vez mais urgente por tratamentos próprios em bovinos de leite para as afecções podais (Blowey et al., 2003; Logue et al., 2012). O modelo de simulação em bancada VacaPed[®] se propõe em ser uma ferramenta para acelerar a busca por novas substâncias a serem empregadas posteriormente em pedilúvios.

Material e métodos:

O experimento ao todo foi dividido em quatro partes:

A primeira parte foi a confecção de um modelo de simulação de pedilúvio consistindo em um simulacro em vidro temperado com 80 cm de comprimento, 50 cm de altura, 40 cm de largura para abrigar 30 litros de solução de banho a 10 cm de profundidade. Para a simulação da movimentação do líquido pela passagem dos animais, utilizamos de um servo motor, modelo TRAXXAS 2018 acoplado a duas hastes de inox as quais continham em sua extremidade uma unha extraída do cório digital bovino segundo Ossent & Lischer, (1997).

Para a programação do servo motor utilizamos o ambiente de desenvolvimento integrado (Integrated Development Environment) IDE Arduino com a linguagem de programação C++. O funcionamento do sistema consta na figura 1 e

os algoritmos de programação no Anexo A. Todo o ensaio descrito a seguir foi realizado com três repetições em três momentos distintos e em triplicata.

Para adicionarmos quantidades de fezes bovinas, semelhantes às encontradas em um pedilúvio de campo, ao modelo de bancada, preenchemos um pedilúvio existente na leiteria da Fazenda Experimental Gralha Azul, Fazenda Rio Grande PR com 318 litros de água. Em seguida houve a passagem de vacas pelo pedilúvio, seguindo o regime normal de ordenhas. Após cada ordenha, homogeneizou-se uniformemente o conteúdo do pedilúvio recolheram-se amostras de sete pontos de coleta, que incluíram os cantos (4 pontos), as regiões intermediárias entre o comprimento de um canto a outro (2 pontos) e um ponto ao centro do pedilúvio. Amostras foram tomadas a cada 120 passagens, para mensuração do teor de matéria seca existente no líquido de banho, em quatro momentos (120, 240, 360 e 600 passagens). A amostragem foi realizada em três períodos distintos sendo o primeiro realizado em agosto de 2015, o segundo em setembro de 2015 e o terceiro realizado no mês de outubro de 2015. As amostras obtidas (n= 12) dos 4 momentos dos três períodos foram pesadas, retirou-se uma alíquota de 30 g, pré secou-se (65 a 70 °C por 72 horas), em seguida submeteu-se à temperatura de 105°C por 24 horas. O teor de umidade foi obtido através da diferença final de peso.

A matéria seca foi medida igualmente em um pool de amostras de fezes com três repetições, oriundas diretamente de animais, imediatamente após serem depositadas ao piso das instalações para que pudéssemos estimar a quantidade de fezes frescas presentes no pedilúvio para adição manual posterior no modelo de bancada. As alterações de pH, concentração de sais e sólidos dissolvidos totais, TDS, foram mensuradas com aparelho portátil PCE-PHD1® após as 120, 240, 360 e 600 passagens pelo pedilúvio (Tabela 1).

Tabela 1: Valores observados em pedilúvio de campo para pH, TDS, Sal, Temperatura (°c), matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO). Médias de MS e MO que foram utilizadas para adição manual de fezes bovinas ao modelo de simulação de pedilúvio de bancada

	Passagem	TDS ppm	Sal	° C	pH	MS%	MO%
	120	1270	0,07	18,1	7,38	0,36	2,55
	240	1470	0,12	21,9	7,29	1,3	9,23
	360	3490	0,28	21,0	6,48	5,2	36,90
	600	4120	0,33	15,5	6,14	4,57	32,43
	120	958	0,08	18,3	7,32	0,4	2,83
	240	2230	0,18	18,9	7,12	1,2	8,51
	360	3360	0,26	20,5	6,78	5,06	35,91
	600	3120	0,25	21,6	6,45	4,7	33,35
	120	1028	0,09	19,4	7,02	0,7	4,96
	240	2280	0,18	22,3	6,61	1,7	12,06
	360	2600	0,21	19,7	6,37	4,2	29,81
	600	2270	0,20	21,0	6,6	3,9	27,67
\bar{x}	120	1085	0,08	18,6	7,24	0,48	3,46
\bar{x}	240	1993	0,16	21,0	7,00	1,40	9,93
\bar{x}	360	3150	0,25	20,4	6,54	4,82	34,21
\bar{x}	600	3170	0,26	19,4	6,39	4,39	31,16

A segunda etapa ocorreu após o estabelecimento dos valores obtidos no pedilúvio a campo em que as mesmas mensurações foram realizadas “*in vitro*” usando-se o modelo VacaPed[®]. Estas foram comparadas entre si para a avaliação do comportamento da solução de banho em pedilúvio de campo e no modelo *in vitro*, respeitando-se um intervalo correspondente ao intervalo entre ordenhas e adicionando-se quantidade de matéria orgânica correspondente as médias das três mensurações (realizadas nos meses de agosto, setembro e outubro de 2015) em pedilúvio de campo. Para efeito de cálculo da quantidade de fezes a ser adicionada durante a simulação, utilizamos o valor médio de matéria seca encontrado nas fezes frescas (14,09 %) para calcular, com base na matéria seca encontrada nos momentos de coleta no pedilúvio de campo, a quantidade de fezes frescas a serem adicionadas durante os momentos de simulação. Totalizou-se 10264 g de fezes bovinas durante toda a simulação.

A terceira etapa consistiu da realização de análises microbiológicas de aeróbios mesófilos dos líquidos contaminados com material orgânico correspondendo ao controle negativo CN (apenas com água e material orgânico como líquido de banho), e utilizando-se o CuSO₄ 2% + Formaldeído 3% como líquido

de banho (controle positivo CP). Além disso, avaliou-se também a formação de biofilmes sobre a parede do casco bovino. Foi realizada contagem total de microrganismos aeróbicos mesófilos em ágar padrão de contagem e solução salina peptonada 0,1% como diluente.

Para a mensuração no líquido de banho foram coletadas amostras de 100 ml de líquido divididas em 7 pontos de amostragem, incluindo os quatro cantos do simulacro, dois pontos intermediários da largura do simulacro, e a zona central do mesmo, em seguida foi homogeneizado a amostra em um béquer e então colhidos 10 ml desta e ressuspendido em 90 ml de solução salina peptonada 0,1% estéril. Em seguida foram realizadas diluições seriadas da solução e inoculado 0,05 ml em ágar padrão de contagem bacteriana em placas. A contagem no líquido realizou-se com amostras obtidas nos momentos correspondentes a 120 passagens (3,456% de fezes bovinas), 240 passagens (12 horas após as 120 passagens- 9,93% de fezes bovinas), 360 passagens (8 horas após as 240 passagens- 34,21% de fezes bovinas), 600 passagens (34,21% de fezes) e 900 passagens (34,21% de fezes) que foram realizadas imediatamente na sequência das 360 passagens totalizando mais 3 horas ao final das 360 passagens.

A quarta etapa foi a mensuração da aderência bacteriana à superfície do casco bovino e a formação de biofilmes bacterianos. Utilizamos de fragmentos de 0,5 cm² obtidos da parede lateral do casco bovino. Os fragmentos foram submetidos à esterilização através do óxido de etileno para se evitar alterações estruturais da queratina devida às altas temperaturas do processo de autoclavagem. Membranas de fita adesiva de polietileno e algodão destinada ao isolamento da face interna destes fragmentos também foram esterilizadas.

Para realizar a mensuração da aderência bacteriana nos fragmentos de casco bovino, isolamos a face interna do fragmento, a qual não entra em contato com o meio externo no animal vivo, com adesivo de polietileno e algodão em seguida impermeabilizamos a face externa da fita com esmalte incolor. Após a secagem do esmalte, os fragmentos foram imersos por 24 horas no esterco extraído diretamente das instalações dos animais, e que se apresentava sem alterações como liquefação ou perda de coesão das fezes, vindas de animais saudáveis, sem alterações gastrointestinais. Após este processo os fragmentos foram retirados do esterco, lavados levemente com pisseta, contendo água destilada, pela superfície envolvida

com a fita adesiva de forma a retirar colônias fracamente aderidas à superfície do casco. Em seguida aguardou-se a secagem dos fragmentos por 10 minutos, a temperatura ambiente. O fragmento então foi submetido ao líquido teste (CN ou CP) em imersões que totalizaram um tempo de 20s distribuídos em duas imersões consecutivas de 10s. Aos líquidos testes não era acrescentado material orgânico (0 passagens) ou adicionava-se material orgânico correspondente às 120 (3,46%), 240 (9,93% de MO), 360 passagens (34,21% de MO) perfazendo um tempo total de simulação de 23 horas da mesma forma e ao mesmo tempo em que a simulação no líquido de banho era realizada no simulacro.

A partir das 360 passagens não foi mais realizada a simulação com imersão de fragmentos, pois este foi o ponto de maior concentração de matéria orgânica no líquido de banho representando o ponto de maior concentração de fezes de toda a simulação. Após a última imersão, novamente se aguardou a secagem dos fragmentos, removeu-se a fita adesiva e acondicionou-se o fragmento em tubos Falcon contendo 10 ml de solução salina peptonada estéril 0,1%, e levados ao banho com ultrassom por 30 minutos para desprendimento de um possível biofilme. Após este período foram realizadas as diluições logarítmicas correspondentes, e inoculado 0,05 ml em Agar padrão de contagem. Em seguida incubaram-se estas placas a uma temperatura de 37,5°C por 48 horas para então ser realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

Para o controle absoluto, três fragmentos foram expostos às fezes bovinas por 24 horas, em seguida foram retirados, lavados conforme descrito anteriormente, alocados em tubos Falcon com 10 ml de diluente, levados ao banho com ultrassom por 30 minutos e o conteúdo dos tubos inoculado em placas conforme descrito anteriormente.

Para análise estatística foi utilizado o teste de normalidade de D' Agostino & Pearson seguido de análise de variância ANOVA e teste t pareado. Foi realizada também a correlação de Spearman com 99 % de intervalo de confiança. Para a comparação da proliferação microbiológica, os dados sofreram transformação logarítmica, seguida de análise de variância ANOVA e teste t pareado. Utilizou-se o software Graphpad Prisma® 2006 para estas análises.

Resultados: Os resultados colhidos no pedilúvio de campo demonstraram uma ampla variação nas avaliações físico-químicas realizadas de TDS, concentração de sais e pH, entre as três repetições. Pode-se notar uma tendência de queda no pH da solução após sucessivas passagens. Nota-se também um aumento gradativo de MS seguido de uma relativa estabilidade ao redor de 360 passagens com equação linear $[(y=2,17x-2,1067) R^2 = 0,90]$ onde x representa os tempos correspondentes ao intervalo de passagem de animais sendo $x=1$ (120 passagens), $x=2$ (240 passagens), $x=3$ (360 passagens), $x=4$ (480 passagens), $x=5$ (600 passagens), $x=6$ (720 passagens), $x=7$ (840 passagens), $x=8$ (960 passagens) e assim por diante. Os mesmos resultados foram observados para a matéria orgânica (Mo) a qual apresentou a equação linear $[(y=15,377X-14,889)R^2 =0,8995]$. Pode-se fazer previsões das concentrações de MS e Mo a partir destas equações, optando-se por interromper a adição de MO a partir de 360 passagens.

Os valores de TDS e sal acompanham esta tendência perceptível com a MS, bem como a variação nas concentrações de matéria orgânica (Tabela 1). Notamos que existe um alto índice de correlação com 99% de intervalo de confiança entre o pedilúvio de campo e o VacaPed® (Figura 1) nos mesmos números de passagens de animais (Tabela 2), que variou de 0,87 para o pH a 0,96 para TDS, ou seja, uma semelhança de comportamento das soluções no modelo e no pedilúvio de campo.

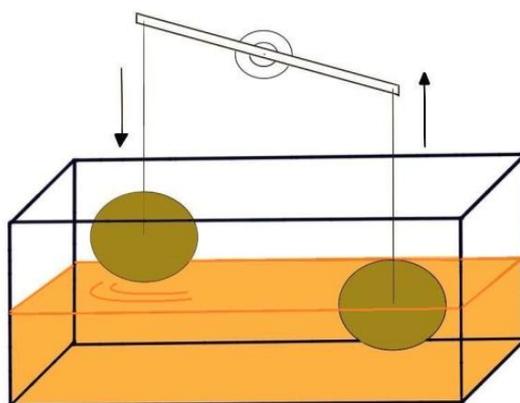


Figura 1: Esquema de funcionamento do modelo de pedilúvio de bancada VacaPed®, Círculos marrons representando os cascos e o líquido em laranja. Flechas indicam o movimento de imersão e retirada (1 passagem).

Tabela 2: Correlação de Spearman entre os valores simulados *in vitro* e encontrados no pedilúvio de campo

	1	2	3	4	5	6
1 TDS ppm em pedilúvio de campo		0,999	-0,990	0,953	0,967	-0,924
2 Sal % em pedilúvio de campo	0,999		-0,990	0,950	0,972	-0,924
3 pH em pedilúvio de campo	-0,990	-0,990		-0,975	-0,972	0,870
4 Sal % em modelo de bancada	0,953	0,950	-0,975		0,966	-0,778
5 TDS ppm em modelo de bancada	0,967	0,972	-0,972	0,966		-0,845
6 pH em modelo de bancada	-0,924	-0,924	0,870	-0,778	-0,845	

Houve diferença significativa entre os valores de TDS e % de sal (gráficos 1 e 2 entre o pedilúvio de campo e o modelo de simulação *in vitro* VacaPed®).

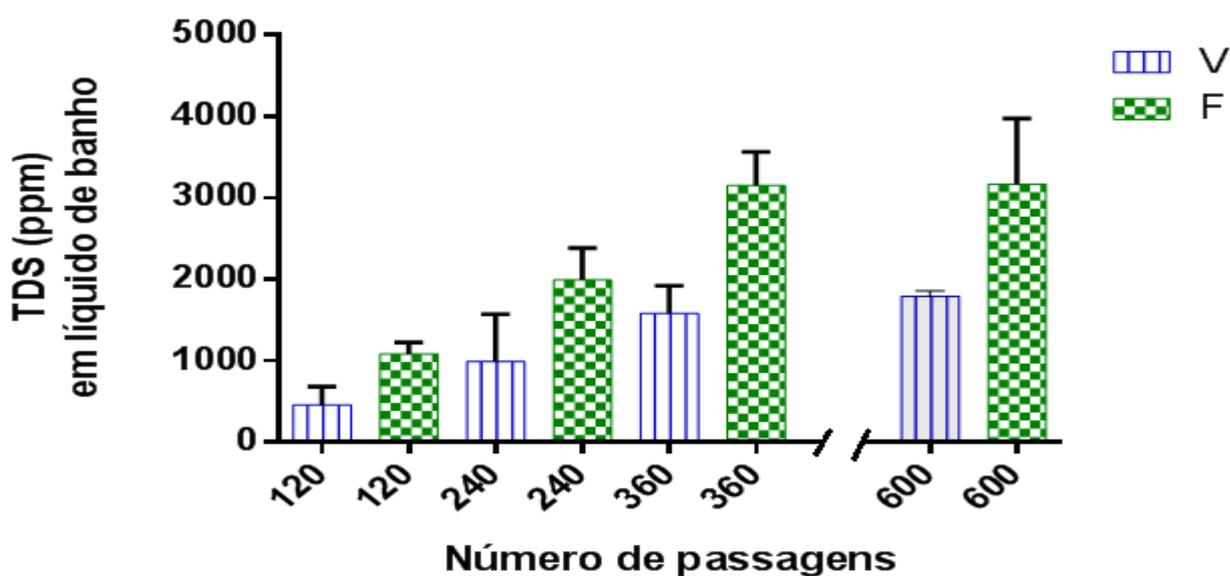


Gráfico 1: Comparação do comportamento do TDS em pedilúvio de campo (F) e modelo de pedilúvio de bancada VacaPed® (V). $V \neq F$ para $p = 0,0039$.

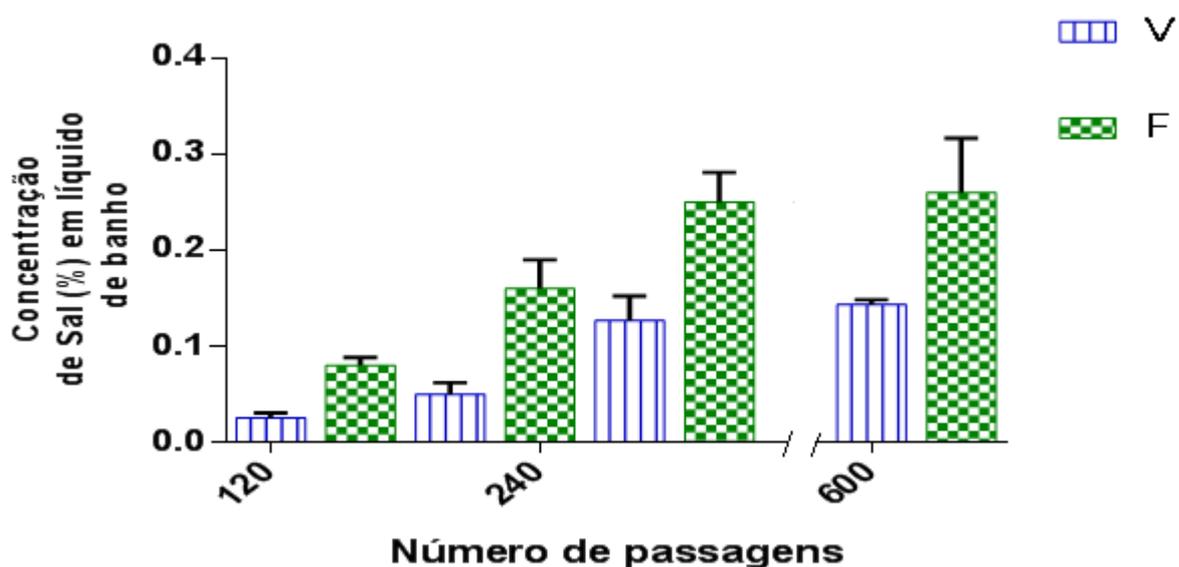


Gráfico 2: Comparação do comportamento das concentrações de sal (%) em pedilúvio de campo (F) em comparação ao modelo de pedilúvio de bancada (V) $V \neq F$ para $p = 0,0039$.

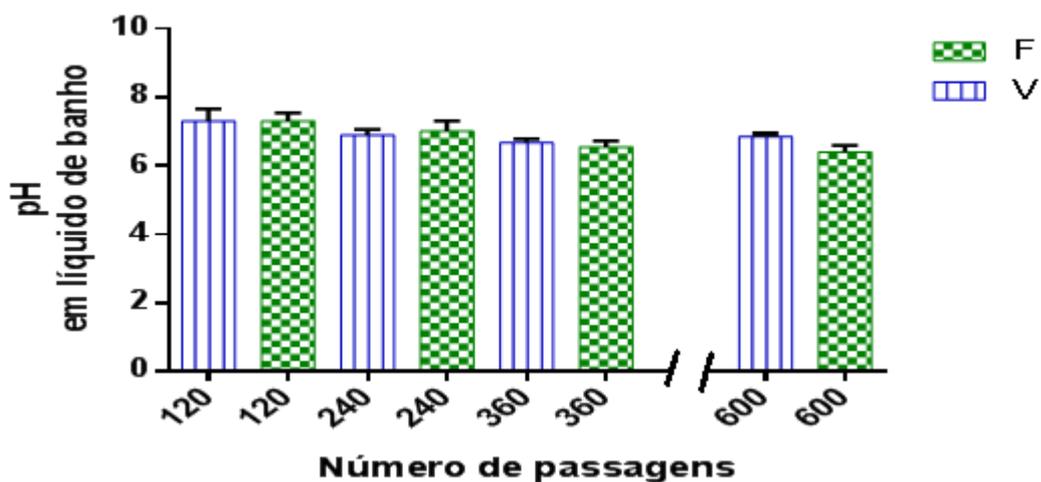


Gráfico 3: Comportamento do pH entre as avaliações em pedilúvio de campo (F) e em modelo de bancada (V), $V = F$ para $p = 0,57$

Conforme os resultados expressos nos gráficos 1 ao 3, bem como na tabela 2 o modelo VacaPed® é capaz de simular o que acontece sob condições de campo. Diferenças foram observadas nos valores de TDS e sal porém com grande correlação entre ambos.

O gráfico 4 mostra a contagem bacteriana no líquido do modelo de simulação para os tratamentos CP e CN entre 3,46 á 34,21% de MO no líquido de ensaio. O valor médio de UFC/ml para o CP foi de $0,94 \pm 0.4087$ Log e 3.57 ± 0.46 Log UFC/ml para o CN. A tabela 3 mostra a diferença nas contagens bacterianas nos fragmentos de cascos para o CN, CP e sem tratamento algum.

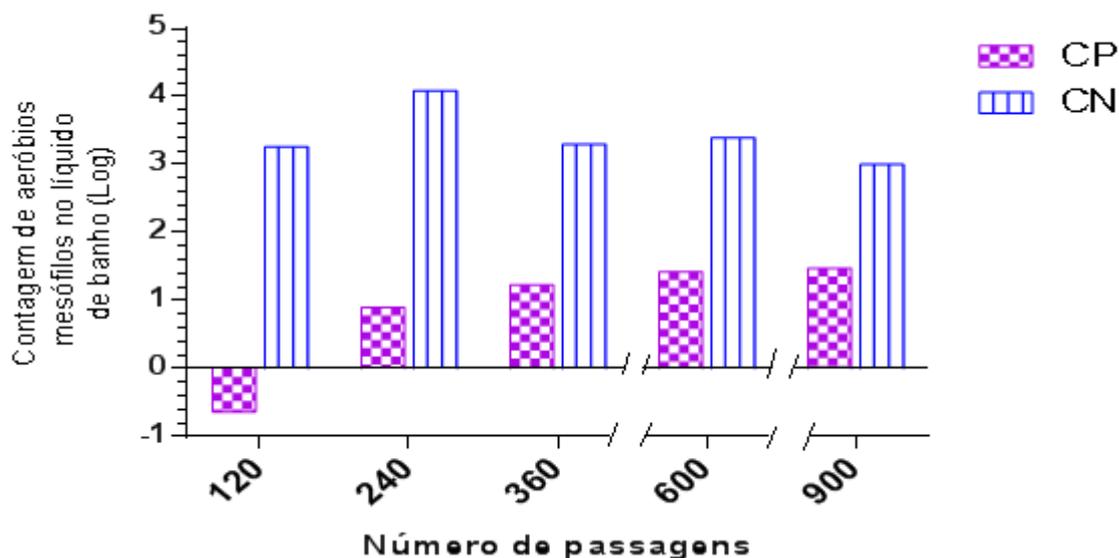


Gráfico 4: Média de unidades formadoras de colônia (UFC) em Log no líquido contido no VacaPed® após três repetições, para o tratamento controle positivo (CP) e controle negativo (CN). CN ≠ CP para $p < 0,0001$

Tabela 3: Comparação entre a eficácia dos tratamentos T3 e T4 frente aos controles positivo CP e negativo CN, na redução da aderência bacteriana à superfície do casco bovino em relação à elevação da concentração de matéria orgânica no líquido de banho sob simulação em pedilúvio de bancada.

	CN (\bar{X})	CP (\bar{X})	Sem tratamento (\bar{X})
O % (MO)	3,46 ^{a*}	3,11 ^{b*}	5,48 ^{c*}
3,46 % (MO)	3,57 ^{a*}	3,29 ^{a*}	5,48 ^{b*}
9,93 % (MO)	4,17 ^{a**}	4,11 ^{a**}	5,48 ^{b*}
34,21 % (MO)	3,52 ^{a*}	3,69 ^{a*}	5,48 ^{b*}

Letras iguais na mesma linha - valores que não diferiram estatisticamente. Números iguais de * na mesma coluna - valores que não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$).

Em relação às avaliações microbiológicas, no modelo de simulação de bancada, houve uma forte capacidade do CuSO_4 2% + formaldeído 3% em reduzir as contagens bacterianas de 3,57 Log para 0,94 Log ($p < 0,0001$) se comparado apenas à água. Em valores absolutos temos uma média aproximada $10,3 \times 10^6$ Log UFC para a água e aproximadamente $15,5 \times 10^3$ Log UFC para o tratamento

controle positivo com CuSO_4 2% + Formol 3%. Em relação à fixação das bactérias a superfície do casco, bem como a redução de biofilmes, houve diferença entre o tratamento controle a base de água com o tratamento à base de CuSO_4 2% e formaldeído 3% apenas quando não havia matéria orgânica no líquido de banho (3,46 Log UFC/cm² para CN e 3,11 Log UFC/cm² para CP) Na avaliação da média de todos os tempos de simulação entre os grupos não houve diferenças significativas ($p= 0,13$), ficando as contagens médias em 10×10^6 Log para a água e aproximadamente 9×10^6 Log para o tratamento controle positivo.

Ambos os controles reduziram as contagens bacterianas nos fragmentos como se se comparado com o controle absoluto exposto apenas as fezes bovinas sem tratamento algum ($1,6 \times 10^9$ Log $p < 0,0001$).

Discussão:

Ao estabelecermos o padrão no pedilúvio de campo através de três repetições, pudemos observar certa estabilização dos parâmetros avaliados a partir das 360 passagens. Onde o cotejo (entre o que foi encontrado em relação à MS e MO) através da equação linear obtida a partir dos dados demonstrou que a concentração esperada de fezes para 600 passagens seria de 66,9 % de matéria orgânica, em comparação a 31,16% que foi verificado como média das três mensurações realizadas em pedilúvio de campo. A deposição de material orgânico em pedilúvios não segue uma tendência linear. Aparentemente ocorreu um ponto de saturação das concentrações de fezes, contrariando a equação de predição linear, onde se extrapolássemos para os períodos posteriores de passagens de animais, respeitando o número de 120 passagens por períodos, chegaríamos a uma concentração de matéria seca nas 960 passagens de 15,25% no líquido de banho o que corresponderia a aproximadamente a quantidade de matéria seca presente nas fezes puras encontradas no experimento. Grongnet et al., (1981) trabalhando com uma metodologia um pouco diferente, estabeleceram como valor máximo de efeito microbicida para o CuSO_4 a formalina nas mesmas concentrações usadas no presente experimento o número de 900 passagens. Como verificamos que a contaminação por matéria orgânica tende a saturar a solvente água a partir de 360 passagens (gráfico 4), sugerimos que os produtos a serem testados para uso em pedilúvio devem manter sua atividade para além das 360 passagens (34,21% de

MO) e se possível ainda terem alguma efetividade no controle bacteriano sobre as fezes frescas.

Os valores de deposição de MO também podem ser influenciados pela dimensão do pedilúvio, a presença ou não de pré-banhos, e o comportamento dos animais, sendo que estes podem aumentar ou diminuir a frequência de defecação dentro do conteúdo de banho (Blowey & Chesterton, 2012).

TDS é uma mensuração de matéria orgânica, sais (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , N^{1+} , K^{1+} , HCO_3) e outros elementos, sendo que sulfatos, cloro e compostos nitrogenados podem elevar grandemente estes valores (Howard et al., 1933). Não existem estudos que levem em conta estes fatores sobre a proliferação bacteriana em pedilúvios.

Modelos de pedilúvios padronizados são necessários (Cook et al., 2012), assim como a busca de substâncias alternativas para uso em pedilúvios, com menores impactos sobre a saúde animal, humana e do ambiente (Teixeira et al., 2010; Smith et al., 2014, Holzhauser et al., 2015; Silva et al., 2015). No entanto, justamente a grande variabilidade de pedilúvios existentes mundialmente (Cook et al., 2012) dificulta a comparação de resultados obtidos a campo. Igualmente a grande possibilidade de diferentes fatores de interferência, existente a campo, além de aspectos ligados à ética de experimentação animal, dificultam a execução de testes a campo principalmente em fase de triagem de substâncias.

Em relação ao pH, não houve diferença significativa entre pedilúvio de campo e a simulação no VacaPed[®] (gráfico 3 $p= 0,5726$), portanto provavelmente os ácidos orgânicos contidos em fezes, além de processos fermentativos, agiram de forma semelhante tanto a campo quanto na simulação.

Poucos relatos existem sobre a ação do CuSO_4 e formaldeído em controlar ou inibir a proliferação bacteriana que ocorre no pedilúvio (Grongnet et al., 1981, Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2002, Silva et al., 2007). O tratamento contendo estes dois elementos se mostrou efetivo em controlar as populações de aeróbios mesófilos no líquido de banho, porém em relação à formação de biofilmes o mesmo não se mostrou mais efetivo do que a água sendo então o seu efeito restrito a células bacterianas planctônicas.

Kulow et al. (2015) em trabalho com cepas de microrganismos envolvidos em infecções e doenças podais (*Campylobacter* sp, *Dichelobacter* sp, *Fusobacterium*

sp, *Porphyromonas* sp, *Prevotella* sp, *Treponema* sp.), utilizando produto comercial à base de timol 0,20% encontraram doses inibitórias mínimas abaixo da recomendada para uso pelo fabricante, porém não consideraram as condições encontradas em pedilúvios de campo, pois o experimento foi inteiramente conduzido em laboratório sem a adição de matéria orgânica ao meio. A simulação com o VacaPed[®] poderá cobrir estas lacunas na busca por novas substâncias, bem como após o processo de triagem podem acelerar os testes com cepas bacterianas específicas.

Como o modelo simula a passagem do estojo córneo pelo pedilúvio, com momentos de imersão e retirada da solução, este poderá prestar-se igualmente para simular de maneira mais fidedigna a ação de chorume, e outros líquidos do ambiente de estábulo, sobre o estojo córneo como demonstrado por Higuchi et al., (2009). Gregory, (2004) observou a ação do formaldeído na redução dos efeitos da ureia e sulfitos sobre a estrutura, e conseqüentemente, a rigidez de cascos expostos ao chorume, o que também poderá ser aplicado a outras substâncias que venham a ser triadas no modelo VacaPed[®]. Avaliações das ações sobre o estojo córneo quando em uso no modelo VacaPed[®] irão ser realizadas no futuro.

Como no modelo VacaPed[®] há uma redução de custos, assim como uma maior agilidade nos testes, por constituir ainda uma etapa pré-clínica, a triagem de diferentes substâncias é viabilizada.

Conclusão: O modelo VacaPed[®] poderá ser utilizado para a triagem de substâncias com potencial para serem utilizadas em pedilúvios de campo.

Agradecimentos: A fundação Araucária pelo apoio financeiro ao projeto e a PUCPR pelo apoio financeiro através da bolsa Marcelino Champagnat.

CAPÍTULO 4

TESTE DE POTENCIAIS SUBSTÂNCIAS SUBSTITUTAS DO SULFATO DE COBRE E FORMALDEÍDO PARA USO EM PEDILÚVIOS BOVINOS

TEST FOR POTENTIAL SUBSTANCES SUBSTITUTES TO COPPER SULFAT AND FORMALIN USED IN CATTLE FOOTBATH

Alesson Rodrigo Bueno Debas
Larissa Chagas
Fernando Bittencourt Luciano
Rudiger Daniel Ollhoff

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar soluções de pedilúvio elaboradas a partir dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (0,17% v/v), de *Eucalyptus globolus* (0,41% v/v), *Thymus vulgaris* (0,13% v/v) e de taninos derivados de *Acacia mearnsii* (15% m/v). As soluções foram avaliadas segundo características físico-químicas tais como pH, sólidos dissolvidos totais e sais. Análises microbiológicas foram realizadas, avaliou-se a capacidade de inibição da proliferação de mesófilos e a capacidade dos tratamentos de inibir a formação de biofilme sobre o casco bovino. As soluções foram testadas em laboratório em modelo denominado VacaPed®. As soluções de *Thymus vulgaris* (0,13%v/v) e de taninos derivados de *Acacia mearnsii* (15% m/v) foram testadas a campo para inocuidade em sua ação sobre o casco de doze vacas saudáveis. A concentração das soluções seguiu critério econômico possuindo custo semelhante ao controle positivo (CP) de CuSO₄ 2% + Formaldeído 3%. Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Eucalyptus globolus* nas concentrações testadas não inibiram a proliferação de mesófilos no líquido de banho. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* se mostrou superior ao controle negativo (CN) com água e próximos da capacidade de inibição do CP em concentrações de fezes bovinas de até 9,93% no líquido de banho mantendo, neste intervalo, contagens bacterianas entre 1,14 á 1,69 Log UFC ml contra 2,44 á 4,043 Log UFC ml para o CN e 0,35 a 0,97 Log UFC ml para o CP. Os taninos derivados da *Acacia mearnsii* não se mostraram efetivos no controle da proliferação bacteriana no líquido de banho e na superfície dos cascos bovinos. Tanto o CP quanto o T3 se mostraram semelhantes ao CN em reduzir a formação de biofilmes. As soluções teste não agrediram a integridade da pele e do estojo córneo das vacas quando do teste a campo após nove dias de exposição diária. O modelo de bancada se mostrou efetivo em acelerar a busca por novas substâncias a serem utilizadas em pedilúvio bovino.

Palavras chave: Pedilúvio bovino, Substâncias alternativas, mesófilos.

Introdução

Pedilúvios são recipientes instalados na entrada ou saída de salas de ordenha, destinados a aplicação de substâncias com fins terapêuticos ou profiláticos aos dígitos de bovinos sendo geralmente utilizados o formaldeído e o CuSO_4 como soluções de banho (Grongnet et al., 1981; Arkins et al., 1986; Cunha et al., 2002; Bergsten et al., 2006; Speijers et al., 2010; Holzhauer et al. 2012; Holzhauer et al. 2012). Pedilúvios no geral são pouco padronizados ocorrendo uma grande variação nas suas medidas pelo mundo (Cook et al., 2012; Hoffmann, 2012). Podem ser empregados para o tratamento ou prevenção na dermatite digital, interdigital, erosão de talão, úlceras e hemorragias de sola dentre outras (Arkins et al., 1986; Bergsten et al., 2006; Fjeldas et al., 2014).

O uso de pedilúvios para aplicação massal diminui os inconvenientes de mão de obra para o tratamento tópico individual das lesões (Laven, 2006) facilitando por sua vez a aplicação em grande escala e de forma rotineira. A profilaxia, visando principalmente à redução do conteúdo de água da parede do casco, também é uma alternativa de uso do pedilúvio, visto que o conteúdo de água neste está diretamente relacionado com lesões podais e a severidade destas (Arkins et al., 1986; Borderas et al., 2004; Randhawa et al., 2008; Higuchi et al., 2009). Foram testadas diversas substâncias como polihexametileno biguanida, hipoclorito de sódio, óleos essenciais e outras soluções desinfetantes, sendo que no geral o CuSO_4 ou o formaldeído se mostraram superiores no controle microbiológico ou no controle de doenças digitais (Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2002; Laven & Hunt, 2002; Silva et al., 2007; Thomsen et al., 2008; Teixeira et al., 2010; Kulow et al., 2015).

Como a maioria das enfermidades podais é infecciosa (exemplos: dermatite digital bovina, erosão de talão) ou está sujeito à infecção secundária pela alta contaminação local (exemplo doença da linha branca, úlcera de sola) substâncias de ação antimicrobiana, controladoras da microbiota e cicatrizantes são de interesse no uso em pedilúvios (Grongnet et al., 1981, Nuss et al., 2006; Teixeira et al., 2010).

No geral, o conteúdo dos pedilúvios é descartado junto com o chorume proveniente do acúmulo de esterco nas instalações dos animais, sendo utilizados geralmente para a fertilização agrícola podendo carrear altas doses de cobre e zinco ao solo (Konzen, 1999; Petersen et al., 2007). O cobre pode se depositar de maneira acumulativa, levando a perdas em algumas culturas agrícolas, danos a microbiota

do solo, reduzindo a reciclagem de elementos, e danos a sistemas aquáticos como alterações nas populações de algas e morte de peixes (Hanson & Stefan, 1984; Flemming & Trevors, 1989; Epperson e Midla, 2007).

O formaldeído por sua vez pode ser lesivo aos seus manipuladores sendo potencialmente carcinogênico, causando efeitos reprodutivos deletérios podendo atravessar a barreira placentária e causar alterações fetais, e de ordem reprodutiva em machos (Kerns et al., 1983; Trasher & Kilburn, 2001; Epperson & Midla, 2007).

O uso de taninos é amplamente discutido na literatura científica com vistas, muitas vezes ao seu uso na cura de couro para confecções (Haslan, 1995). Os taninos apresentam a capacidade de complexação de metais como (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+}); complexação de proteínas e polissacarídeos e a formação de uma espécie de película que gera um ambiente no qual o processo de cicatrização é beneficiado e a atividade antibacteriana é evidenciada (Haslan, 1996; Smith et al., 2003). A geração de peróxido de hidrogênio no meio contendo taninos oriundos da acácia negra quando aerado foi capaz de reduzir a proliferação de *Escherichia coli* (Smith et al., 2003). Os taninos encontrados em *Schinus terebinthifolius* foram também responsabilizados por promoverem uma melhor cicatrização da pele em bovinos (Lipinski et al., 2012). No uso em pedilúvio foram atribuídos a taninos efeitos benéficos de estratos glicólicos de *Stryphnodendron adstringens* sobre o tratamento de DDB (Silva et al., 2015).

Kulow et al., (2015) avaliando cepas de microrganismos envolvidos em infecções e doenças podais como *Campylobacter* sp, *Dichelobacter* sp, *Fusobacterium* sp, *Porphyromonas* sp, *Prevotella* sp e *Treponema* sp, utilizando um produto comercial a base de óleo essencial de tomilho denominado Thymox (Timol 0,23%), encontraram doses inibitórias destes produtos inferiores a recomendada pelo fabricante (1%) o que segundo eles demonstra a capacidade do produto em eventualmente substituir o CuSO_4 a 5%. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* em doses entre 0,25 a 2% v/v controlou biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* formados experimentalmente em placas de poliestireno (Shuneigat et al., 2014).

O óleo essencial de melaleuca é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos e alcoóis (Carson & Riley, 1994; Carson et al., 2006).

Apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana, apresentando concentrações inibitórias mínimas de 0,25 % a 0,5 % para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Cândida albicans*, e de 0.016% a 1% para outras cepas bacterianas, incluindo *Fusobacterium nucleatum* e *Bacterioides* sp. (Mann et al., 2000; Carson et al., 2006). A maioria das cepas bacterianas (Gram positivas, Gram negativas e anaeróbias) é sensível a concentrações de até 1% do óleo essencial (Carson et al., 2006). Sendo que nestas concentrações mínimas inibitórias ocorreram alterações da estrutura de membrana bacteriana com aumento da permeabilidade, e extravasamento de conteúdo intracelular (Carson et al., 2006). Este óleo essencial, em uso tópico apresenta também a capacidade de modulação da atividade imunológica, com redução da produção de TNF α , prostaglandina E₂, interleucina 1 β e interleucina 10 (Caldefie et al., 2006, Carson et al., 2006). Smith et al., (2014) testaram um produto comercial a base de óleo essencial de melaleuca 3 % (Provita Hoofsure[®]). O produto comercial se mostrou similar ao CuSO₄ em reduzir lesões iniciais de DDB.

O gênero *Eucalyptus* é proveniente da Austrália e amplamente cultivado em regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas sendo o seu óleo, e outras partes da planta, utilizado com fins anti-inflamatórios e antissépticos (Rocha & Santos, 2007; Tohidipur et al., 2010). Estudos demonstraram efetividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* contra cepas de estafilococos resistentes a metilina (Tohidipur et al., 2010; Mulyaningsih et al., 2011). Também foi atribuída atividade imunomodulatória ao 1-8 cineol, evidenciada na redução da produção de óxido nítrico e de gama interferon em macrófagos de murinos (Juergens et al., 1998; Juergens et al., 1998b; Vigo et al., 2004; Serafino et al., 2008). Não foi encontrado na literatura consultada o uso de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* em pedilúvios bovinos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar soluções de pedilúvio elaboradas a partir dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (0,17% v/v), de *Eucalyptus globulus* (0,41% v/v), *Thymus vulgaris* (0,13% v/v) e de taninos derivados de *Acacia mearnsii* (15% m/v) em relação ao tratamento padrão utilizado a base de CuSO₄ e formaldeído, bem como avaliar a eficácia destas substâncias em células bacterianas aderidas a parede do casco a fim de buscar novas alternativas ao tratamento padrão visando mitigar os possíveis efeitos deletérios dos tratamentos a base de CuSO₄ e formaldeído ao meio ambiente, à saúde dos animais e de seus manipuladores.

Material e Métodos

O experimento ao todo foi dividido em quatro etapas:

Na primeira etapa foi confeccionado um modelo de simulação de pedilúvio consistindo em um simulacro em vidro temperado com 80 cm de comprimento, 50 cm de altura, 40 cm de largura para abrigar 30 litros de solução de banho a 10 cm de profundidade. Para a simulação da movimentação do líquido pela passagem dos animais, utilizamos de um servo motor, modelo TRAXXAS 2018 acoplado a duas hastes de inox as quais continham cada uma delas uma unha extraída do cório digital bovino segundo Ossent & Lischer, (1997). Para a programação do servo motor utilizamos o ambiente de desenvolvimento integrado (Integrated Development Environment) IDE Arduino com a linguagem de programação C++. O funcionamento do sistema consta na figura 1 e os algoritmos de programação no anexo A.

Todo o ensaio descrito a seguir foi realizado com três repetições em três momentos distintos e em triplicata.

Para simularmos a contaminação por fezes bovinas no pedilúvio de bancada semelhante às encontradas em um pedilúvio de campo, mensurou-se a quantidade de matéria orgânica depositadas por sucessivas passagens de vacas em um pedilúvio em uso na fazenda própria da universidade. Amostras homogêneas foram tomadas a cada 120 passagens, para obtenção do teor de matéria seca existente no líquido de banho, em quatro momentos (120, 240, 360 e 600 passagens). As amostragens ocorreram em três meses distintos em agosto, setembro e outubro de 2015. As amostras obtidas (n= 12) foram pesadas, retirou-se uma alíquota de 30 g, pré secou-se (65 a 70 °C por 72 horas), em seguida submeteu-se à temperatura de 105°C por 24 horas. O teor de umidade foi obtido através da diferença final de peso.

O mesmo procedimento foi realizado com em um pool de amostras de fezes, em três repetições, oriundas diretamente de animais, imediatamente após serem depositadas ao piso das instalações para que pudessemos estimar a quantidade de fezes frescas presentes no pedilúvio para adição manual posterior no modelo de bancada.

As alterações de pH, concentração de sais e sólidos dissolvidos totais, TDS, foram mensuradas com aparelho portátil PCE-PHD1[®] nas 120, 240, 360 e 600 passagens pelo pedilúvio.

Na segunda etapa, pela ausência critério concreto de uso em pedilúvio para a maioria dos óleos essenciais, estabelecemos um critério econômico. Os tratamentos à base de óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globolus*, *Thymus vulgaris* e de taninos derivados de *Acacia mearnsii*, deveriam custar o mesmo valor pago pelos produtores de leite para um tratamento controle positivo a base de CuSO_4 2% + Formaldeído 3% (Grongnet et al., 1981). Para tanto se orçou o preço médio para o tratamento controle positivo em comércio local e eletrônico, excetuando-se grandes indústrias químicas, com acesso restrito a pessoas jurídicas. Com base no valor obtido foram calculadas as doses dos produtos testados. Os valores em Reais (R\$) constam na tabela 2. Os óleos essenciais foram adquiridos da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos essenciais, e os taninos da empresa Seta S/A Extrativa de Taninos de Acácia. A ficha técnica dos produtos, com suas características físico químicas, consta no anexo B.

As substâncias testes foram denominadas de controle negativo CN (apenas com água e material orgânico como líquido de banho), controle positivo (CP) com CuSO_4 2% + Formaldeído 3% como líquido de banho, tratamento T1 com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* 0,17% v/v, tratamento T2 com óleo essencial de *Eucalyptus globolus* 0,41% v/v, tratamento T3 com óleo essencial de *Thymus vulgaris* 0,13% v/v e tratamento T4 com taninos derivados de *Acacia mearnsii* 15% m/v.

Para o tempo de simulação foi respeitado um intervalo correspondente ao período de tempo entre ordenhas adicionando-se a quantidade média de matéria orgânica encontrada após 120 passagens (3,46 %), 240 passagens (12 horas após as 120 passagens com 9,93 % de MO), 360 passagens (8 horas após as 240 passagens com 34,21 % de MO). As 600 (34,21 % de MO) e 900 (34,21 % de MO) passagens foram realizadas imediatamente na sequência das 360 passagens por mais 3 horas após o final das 360 passagens. Para calcular a quantidade de fezes a ser adicionada na solução, simulando a contaminação por MO, utilizamos o valor médio de 14,09 % de matéria seca encontrada na análise das fezes frescas. No total adicionaram-se 10264 g de fezes bovinas em 30 litros de solução de banho por tratamento durante toda a simulação. Foi realizada contagem total de microrganismos aeróbicos mesófilos em ágar padrão de contagem e solução salina

peptonada 0,1% como diluente. Para a mensuração microbiológica no líquido de banho foram colhidas amostras de 100 ml de líquido (dos tratamentos T1, T2, T3 e T4, além dos controles positivo e negativo) divididas em 7 pontos de amostragem, incluindo os quatro cantos do simulacro, dois pontos intermediários da largura do simulacro, e a zona central do mesmo, em seguida foi homogeneizado a amostra em um béquer e então colhido 10 ml desta, ressuspendido em 90 ml de solução salina peptonada 0,1% estéril. Na sequência realizaram-se as diluições seriadas sendo então distribuído 0,05 ml da diluição em ágar padrão de contagem de mesófilos, a incubação ocorreu a uma temperatura de 37,5°C por 48 horas para então ser realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). A contagem no líquido realizou-se com amostras obtidas nos momentos correspondentes a 120, 240, 360, 600 e 900 passagens.

As alterações de pH, concentração de sais e sólidos dissolvidos totais, TDS, foram mensuradas com aparelho portátil PCE-PHD1® nas 120, 240, 360, 600 e 900 passagens pelo modelo de bancada.

Após análises estatísticas prévias da primeira simulação no modelo *in vitro*, os tratamentos T1 e T2 foram excluídos das análises de fixação bacteriana a parede do casco e de efeito direto sobre o dígito de animais, por se mostrarem inefetivos em reduzir as contagens bacterianas no líquido de banho.

Na terceira etapa avaliou-se a formação de biofilmes da parede do casco bovino nos tratamentos T3 e T4. Para a mensuração da aderência bacteriana a superfície do casco bovino e formação de biofilmes utilizaram-se de fragmentos de 0,5 cm² obtidos da parede lateral do casco bovino. Os fragmentos foram submetidos à esterilização através do óxido de etileno para se evitar alterações estruturais da queratina devida às altas temperaturas do processo de autoclavagem, bem como as membranas de fita adesiva de polietileno e algodão destinados ao isolamento da face interna destes fragmentos.

Para realizar a mensuração da aderência bacteriana nos fragmentos de casco bovino, isolamos a face interna do fragmento com adesivo de polietileno e algodão, em seguida impermeabilizamos a face externa da fita com esmalte incolor. Após a secagem do esmalte, os fragmentos foram imersos por 24 horas no esterco extraído diretamente das instalações dos animais, e que se apresentava sem alterações como liquefação ou perda de coesão das fezes, vindas de animais saudáveis, sem

alterações gastrointestinais visíveis. Após este processo os fragmentos foram retirados do esterco, lavados levemente com pisseta, contendo água destilada, pela superfície envolvida com a fita adesiva de forma a retirar colônias fracamente aderidas à superfície do casco, em seguida aguardou-se a secagem dos fragmentos por 10 minutos a temperatura ambiente. O fragmento então foi submerso nas diferentes soluções (CN, CP, T3 e T4) por duas vezes de 10 s cada totalizando 20 s. As soluções podiam não conter material orgânico (0 passagens) ou contê-lo com 3,46%, 9,93%, 34,21% de MO, correspondendo respectivamente às 120, 240 e 360 passagens perfazendo um tempo total de simulação de 23 horas. A partir das 360 passagens não foi mais realizada a simulação com imersão de fragmentos, pois este foi o ponto de maior concentração de matéria orgânica. Após a última imersão, e secagem dos fragmentos, removeu-se a fita adesiva e acondicionou-se o fragmento em tubos Falcon contendo 10 ml de solução salina peptonada estéril 0,1%, sendo levados ao banho com ultrassom por 30 minutos. Após este período foram realizadas as diluições logarítmicas correspondentes, foi feita a inoculação e cultura em ágar padrão de contagem e incubou-se a 37,5 °C por 48 horas. Após este período realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônia em placa.

Para o controle absoluto, três fragmentos de casco foram expostos às fezes de bovinos por 24 horas e processados da mesma maneira para que obtivéssemos as contagens de UFC que se aderiram à superfície do casco antes de serem expostas aos tratamentos.

Na quarta e última etapa as substâncias que se mostraram possivelmente equiparáveis ao tratamento CP (*Thymus vulgaris* T3 e *Acacia mearnsii* T4), foram testadas em pedilúvio de campo. Foram formados dois grupos de seis animais, fêmeas bovinas de 9 a 36 meses de idade os quais receberam os tratamentos com taninos de *Acacia mearnsii*, (n=6 animais de 9 meses de idade), e *Thymus vulgaris* (6 animais com 36 meses de idade média e primeira lactação). Os animais foram passados em dois pedilúvios, cobertos medindo 80 cm de largura por 270 cm de comprimento em uma lâmina de líquido de 10 cm de profundidade. Os pedilúvios foram divididos ao meio com parede em concreto de forma a se isolar o lado direito que recebeu o tratamento teste, do lado esquerdo preenchido com água conforme mostram as fotos da figura 2. Os animais foram passados pelo pedilúvio duas vezes ao dia, de manhã e à tarde por um período de 9 dias, após passarem por um

período de adaptação de 5 dias no qual o pedilúvio foi preenchido para que os animais se acostumassem com a rotina.

Após a passagem dos animais, os mesmos foram conduzidos para um piquete de aproximadamente 500 m² onde foram observados por 20 minutos a fim de se verificar possíveis alterações comportamentais como o ato de lambar o espaço interdigital ou desconforto que levasse a troca constante do membro de apoio. Após estes 20 minutos os animais foram soltos ao piquete maior com nova observação por mais 20 minutos a uma distância de aproximadamente 20 metros. Registros fotográficos foram feitos antes do início do tratamento e após o término do tratamento incluindo tomadas do membro inteiro, do espaço interdigital e visão lateral do membro.

Para análise estatística foi utilizado o teste de normalidade de D' Agostino & Pearson seguido de análise de variância ANOVA e teste t pareado. Para a comparação da proliferação microbiológica, os dados sofreram transformação logarítmica, seguida de análise de variância ANOVA e teste t pareado. Utilizou-se o software Graphpad Prisma[®] 2006.

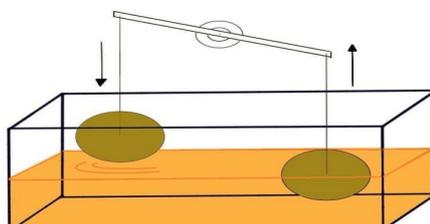


Figura 1: Esquema de funcionamento do modelo de pedilúvio de bancada VacaPed[®], círculos marrons representando os cascos e o líquido em laranja. Flechas indicando o movimento de imersão e retirada (1passagem).



Figura 2: Vista em diagonal e frontal de pedilúvio dividido em duas porções na qual o lado direito continha o tratamento (T3 ou T4), o lado esquerdo continha o controle negativo CN.

Resultados e discussão

Os resultados do levantamento de preços que foram utilizados para a determinação das quantidades de óleos essenciais e de taninos a serem empregados nos tratamentos se encontram na tabela 1.

Podemos observar uma ampla variação nos preços dos insumos, tanto do CuSO_4 , quanto do formaldeído. Os preços foram levantados em sítios digitais e lojas agropecuárias, levando em conta a facilidade de acesso a qualquer produtor interessado na compra destes insumos, quantidades maiores, bem como compras realizadas diretamente de indústrias químicas de acesso restrito a pessoas jurídicas não foram incluídas, embora as mesmas possam baratear o custo médio do tratamento. O custo médio da solução CP com CuSO_4 2% + Formaldeído 3% foi de R\$ 0,9036 por litro. As demais dosagens dos óleos essenciais e dos taninos de *Acacia mearnsii*, foram baseadas diretamente nestes valores.

Tabela 1: Valores médios, mínimos e máximos dos preços de mercado para CuSO_4 em pó e Formaldeído líquido a 37 %. Valores correspondentes e doses economicamente equiparáveis de quatro substâncias antimicrobianas substitutas aos tratamentos com formaldeído e CuSO_4 .

CuSO ₄ preço por kg em R\$ (n=24)	Formaldeído preço por litro em R\$ (n=50)	
R\$ = 19,12 (15,36 a 28,00)	R\$ = 17,83 (6,55 a 49,90)	
Substâncias antimicrobianas a serem testadas	Valor em R\$	Quantidade equiparável à solução controle CuSO_4 2% + Formaldeído 3% em %
Tanino de <i>Acacia mearnsii</i> (kg)	4,34	15-20%
<i>Melaleuca alternifolia</i> (L)	520,00	~0,17%
<i>Eucalyptus globulus</i> (L)	220,00	~0,41%
<i>Thymus vulgaris</i> (L)	720,00	~ 0,13%

Obs.: TOTAL POR LITRO DE SOLUÇÃO CONTROLE R\$ = 0,9036

No caso dos taninos a solução a 20%, que corresponderia ao valor aproximado do CP demonstrou-se demasiadamente saturada optando-se pela redução para 15% de concentração em líquido de banho. Se nos basearmos nas diretrizes estipuladas por Cook et al., (2012), para um pedilúvio com 270 cm de

comprimento, 80 cm de largura preenchido a pelo menos 10 cm de profundidade, teríamos um total de 216 litros de solução empregados a um custo de R\$ 195,18 para a solução CP. Se considerarmos o ponto de saturação de matéria orgânica e estabelecermos este como momento onde o conteúdo do pedilúvio deve ser trocado (360 passagens, tabela 3) o custo será de R\$ 0,54 por passagem de animal, este custo cairia para R\$ 0,216 caso a substância seja efetiva até as 900 passagens como estipulada por Grongnet et al., (1981). Deve-se observar a volatilidade e a redução da concentração de formaldeído no líquido de banho, não devendo o tempo em que os tratamentos são armazenados ao ar livre ser muito alto (Holzhauer et al., 2004).

Em relação ao CP o mesmo demonstrou ser efetivo em maiores concentrações de MO (até 34,21%) sendo um tratamento que pode ser trocado com um maior número de passagem de animais. As concentrações de formaldeído no líquido de banho podem cair a taxas de 50% da concentração inicial em um espaço de tempo aproximado de 2.4 dias, oscilando este valor entre 300 e 320 passagens de animais pela solução de banho, e que pode variar de acordo com a temperatura ambiente, pois um incremento desta poderá aumentar a taxa de evaporação do formaldeído (Holzhauer et al., 2004). Por isso o período de tempo em que a solução de banho é utilizada deverá ser observado para posterior descarte da solução.

Para o óleo essencial de *Melaleuca* foram relatadas doses mínimas inibitórias para algumas cepas bacterianas que oscilaram de 0,016 a 1%, porém a maioria das espécies bacterianas analisadas é sensível a concentrações acima de 0,6%, (Carson et al. 2006). O que pode explicar que a falta de eficiência do tratamento T1 em modular a proliferação de mesófilos foi a dose escolhida, baixa, porém dentro do critério estabelecido de competir economicamente com o CP.

Quanto ao óleo essencial de *Eucalyptus globolus*, as concentrações inibitórias mínimas oscilam de 0,0085 a 0,025% contra cepas bacterianas resistentes a antibióticos (Mulyaningsih et al., 2009; Tohidipur et al., 2010). Mesmo em dosagens mais altas no T2 não encontramos efeitos sobre a proliferação total de mesófilos. A não atuação dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e de *Eucalyptus globolus* nesta concentração pode ser devido ao fato da densidade de ambos serem relativamente baixa (0,885 a 0,930 a 20°C) e a pouca miscibilidade destes óleos puros, não manipulados farmacologicamente, com a água.

O T1 na dose utilizada apresentou resultados similares de inibição da proliferação de mesófilos do CN ($p= 0,95$) ao passo que o T2 apresentou média de UFC superior ao CN ($p= 0,02$) conforme observável no gráfico 1. Por isso ambos os tratamentos foram retirados das fases posteriores do experimento.

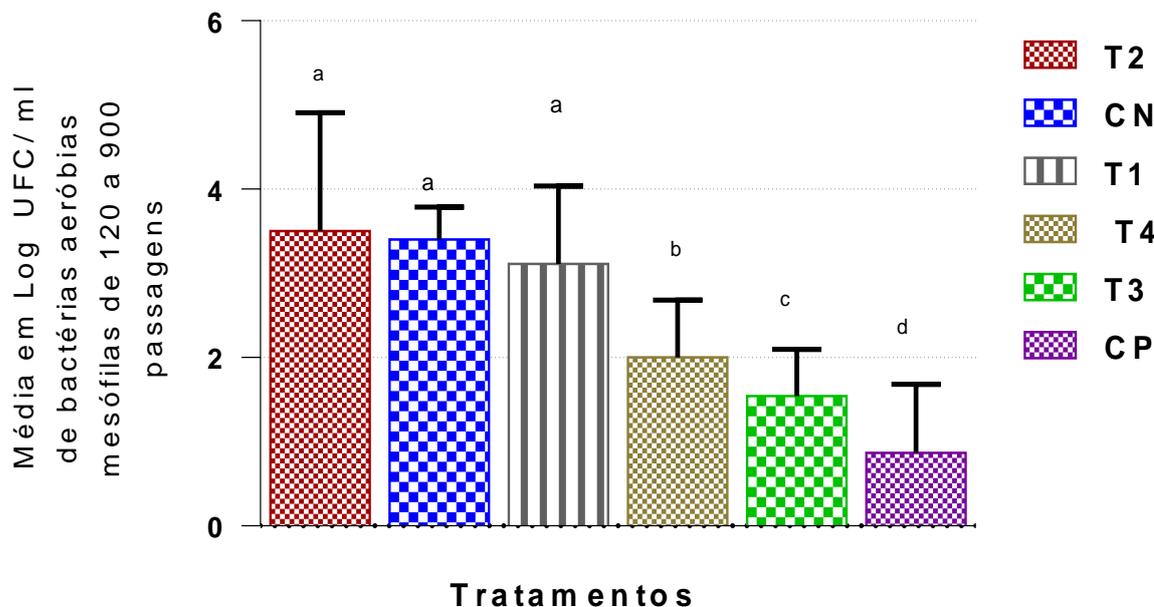


Gráfico 1: Teste piloto em pedilúvio de bancada para comparação dos tratamentos T1 (*Melaleuca alternifolia*), T2 (*Eucalyptus globulus*), T3 (*Thymus vulgaris*) e T4 (taninos de *Acacia mearnsii*) com os CP e CN sobre a proliferação bacteriana, em Log UFC/ ml. Letras diferentes no topo das colunas indicam que houveram diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,0001$.

Os teores de sais e de sólidos dissolvidos totais foram próximos entre o T3 e o CN diferindo brevemente ($p < 0,0001$), porém foram muito diferentes do CP ($p < 0,0001$) (gráfico 2 e 3). O T4 mostrou altas concentrações de TDS e sais que diferiram tanto do CP quanto do CN e do T3 (gráficos 2 e 3).

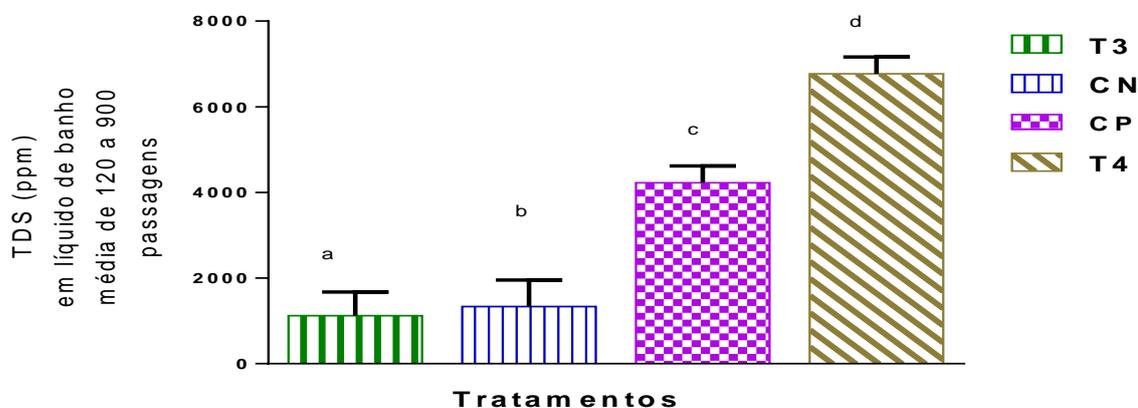


Gráfico 2: Valores de TDS para os tratamentos T3(*Thymus vulgaris*) e T4 (taninos de *Acacia mearnsii*), em comparação com os controles CP (positivo) e CN (negativo) letras diferentes acima das colunas houve diferença entre grupos para $p < 0,0001$.

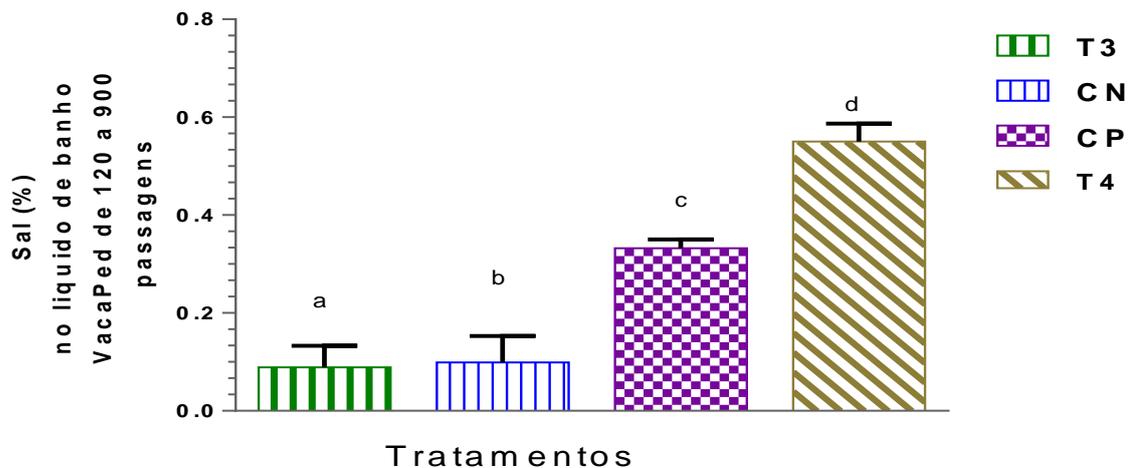


Gráfico 3: Comparação da concentração de sal em% dos tratamentos T3 (*Thymus vulgaris*) e T4 (taninos de *Acacia mearnsii*) com os controles positivo (CP) e negativo (CN). A média dos valores dos grupos marcados com letras diferentes (a, b, c, d) acima das colunas diferiu estatisticamente para $p < 0,0001$.

Quanto ao pH, tanto a mistura contendo *Thymus vulgaris* (pH médio = 7,13) quanto a que continha *Acacia mearnsii* (pH médio = 5,99) diferiram dos controles e entre si o que pode ser observado no gráfico 4. Nenhuma das substâncias apresentou pH alcalino e nem inferior ao pH do CP demonstrando que este não é um fator limitante dos tratamentos.

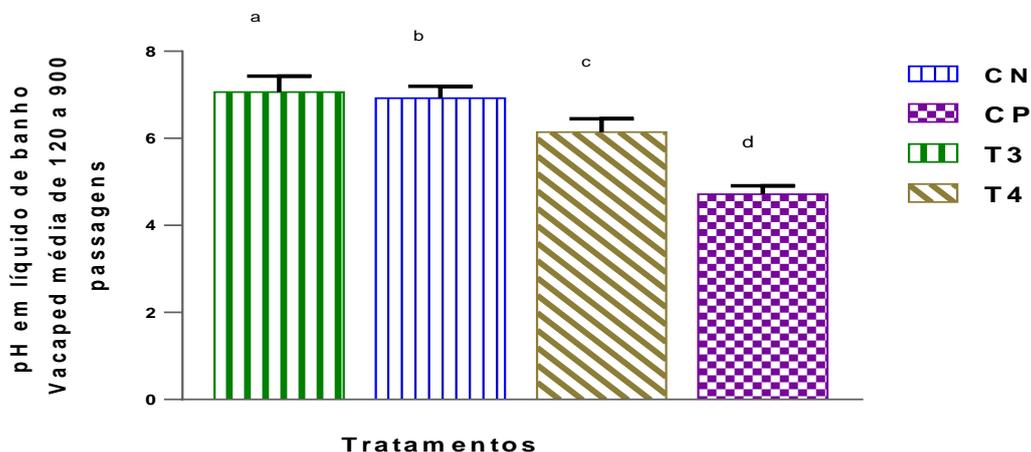


Gráfico 4: Comparação de pH entre ao controle negativo (CN), Positivo (CP), e o tratamento (T3) com *Thymus vulgaris* e T4 com taninos de *Acacia mearnsii*. A média dos valores dos grupos marcados com letras diferentes (a, b, c, d) acima das colunas diferiu estatisticamente para $p < 0,001$.

O T3 foi capaz de reduzir as contagens de mesófilos aeróbios totais de forma mais eficiente do que o CN, porém menos eficiente do que o CP. O CP foi efetivo em manter as contagens bacterianas abaixo da dos tratamentos T3 e T4 em todos os

momentos analisados (gráfico 5). O tratamento com *Thymus vulgaris* demonstrou valores de contagem bacterianas nas primeiras 120 passagens (3,46% MO) semelhante às 240 (9,93% MO) e 600 passagens (34,21% MO) do CP o que demonstrou que o tratamento com *Thymus vulgaris* na dose utilizada não é superior ao CP. O T4 não foi eficiente, pois nas primeiras 120 passagens as contagens de aeróbios mesófilos foram maiores do que as obtidas para o CP e semelhante ao CN como consta no gráfico 5.

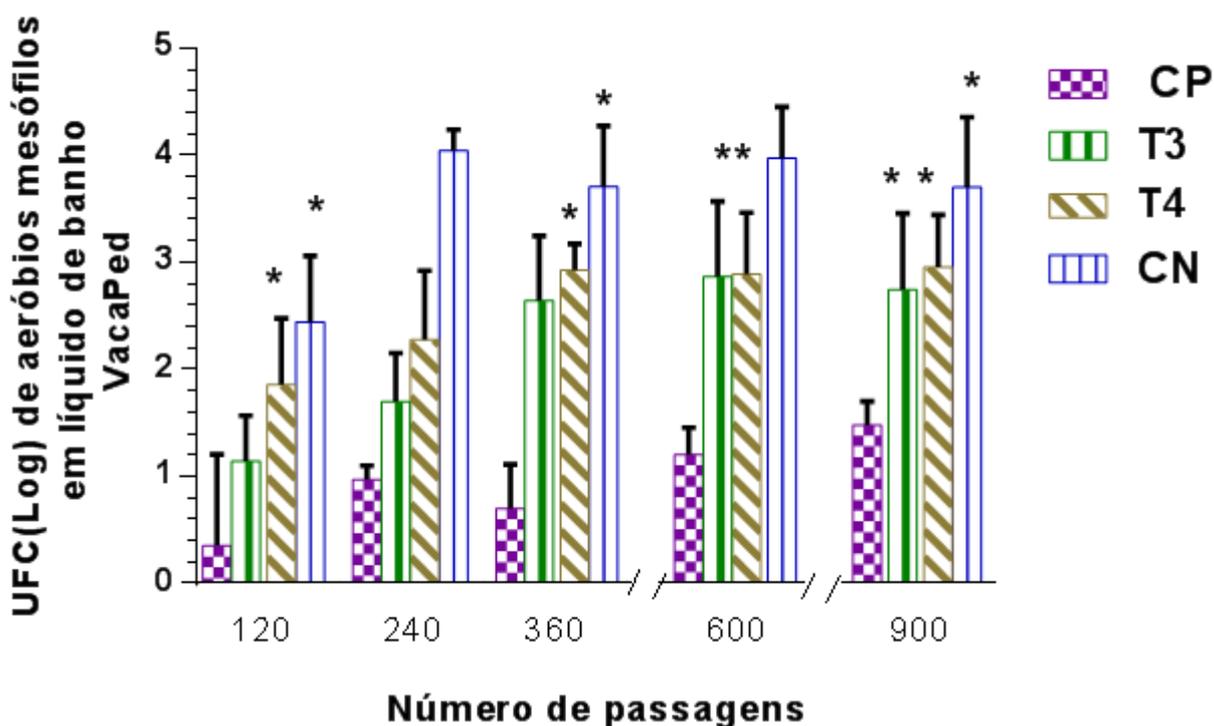


Gráfico 5: Valores médios de UFC, log transformadas, em tempos de simulação com 120(3,46% MO), 240(9,93% MO), 360(34,21% MO), 600(34,21% MO) e 900(34,21% MO) passagens para as três repetições em modelo de pedilúvio de bancada. * acima das colunas demonstram que houve diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada intervalo de simulação para $p < 0,005$

Em estudo realizado por Döpfer et al., (2013) sobre a dermatite digital bovina onde foi utilizado produto comercial a base de óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Thymox 1%®), o mesmo apresentou resultados semelhantes ao grupo tratado com CuSO_4 a 5%, tanto na redução de formas crônicas quanto no número de animais sem lesões de DDB no rebanho. A MIC contra *Treponema* sp. ficou em 0,004% de Thymox® com 20% de esterco bovino. Kulow et al., (2015), encontraram concentrações inibitórias mínimas de Thymox® menores que 0,02% para algumas cepas bacterianas de *Campylobacter faecalis*, *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum*, e também para algumas cepas de *Treponema* sp.,

com um período de exposição de 30 s ficando na média as doses inibitórias em 0,2083% de timol. Estes resultados demonstram que as doses utilizadas no experimento podem ser efetivas contra cepas bacterianas específicas de algumas doenças podais, e que as avaliações microbiológicas mais amplas como a de aeróbios mesófilos, podem ser indicativos para testes futuros das substâncias com cepas bacterianas específicas.

No presente estudo o T3 foi capaz de manter contagens bacterianas estáveis até o intervalo entre 9,93% a 34,21% de MO de matéria orgânica em uma concentração de 0,13% v/v de óleo. O T3 se mostrou superior ao T4 ($p= 0,0008$) com médias que abrangeram todos os momentos analisados variando de 1,14 á 2,74 Log UFC/ml *Thymus vulgaris*, contra 1,85 á 2,96 Log UFC/ml *Acacia mearnsii*) se comparados a variação de 0,35 á 1,48 Log UFC/ml para o CP) e (2,4 a 4,04 Log UFC/ml para o CN). A inefetividade de ambos os tratamentos T3 e T4 a partir das 360 passagens demonstra que a solução de banho deve ser trocada no intervalo entre 240 e 360 passagens. Portanto os tratamentos analisados não se mostraram melhores do que o CP em reduzir as contagens bacterianas.

Quanto a formação de biofilmes o gráfico 6 demonstra os valores obtidos para os tratamentos T3 e T4 em comparação aos controles, notamos que tanto T3 quanto o CN, e o CP foram capazes de reduzir a formação de filmes bacterianos na superfície do casco em comparação com os fragmentos que não foram submetidos a nenhum tratamento, porém não houve diferença significativa entre a média das simulações de 0 a 360 passagens entre T3, CN e CP (p de 0,13 a 0,98).

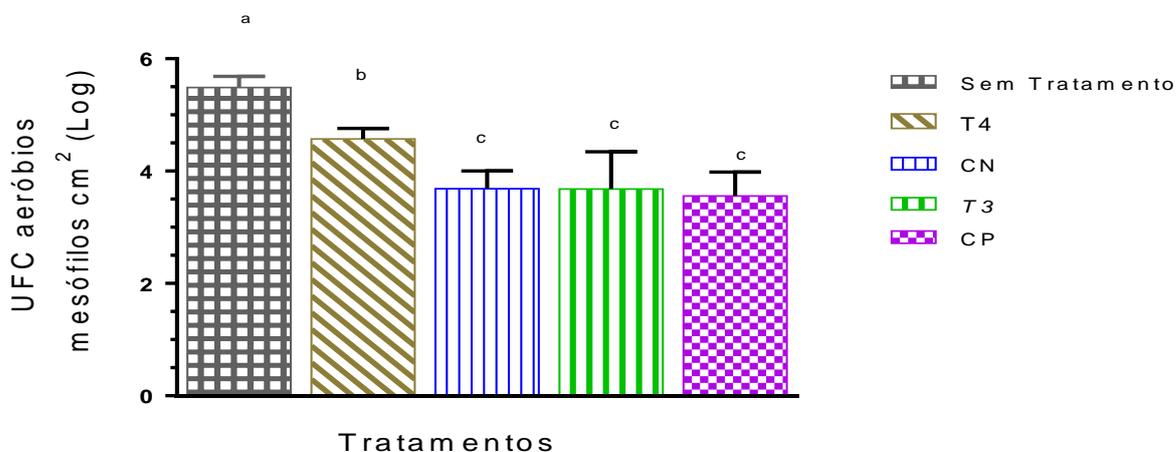


Gráfico 6: Média e desvio padrão da contagem total de microrganismos mesófilos em UFC crescidos sobre estojo córneo bovino de toda a simulação abrangendo 0 (0% MO) a 360 (34,21% MO) passagens. Letras diferentes acima das colunas significam que houve diferença estatística significativa para a média geral dos grupos ($p < 0,0001$).

Em relação as concentrações de matéria orgânica, houve diferenças entre os tratamentos em reduzir os biofilmes formados como pode ser visto na tabela 2, no geral as contagens bacterianas aumentaram entre 0 e 34,21% de matéria orgânica. O tomilho se mostrou equivalente ao CP em reduzir as contagens bacterianas nos fragmentos, sendo ambos mais eficientes que o CN quando na ausência de matéria orgânica vide tabela 2. Nenhum dos tratamentos na média demonstrou ser superior ao CN em controlar a formação de biofilmes, sendo que os mesmos foram mais eficientes do que o CN apenas em controlar células plânctônicas e, portanto, o controle da aderência bacteriana ao casco bovino não parece ser um fator relacionado ao tratamento CP.

Tabela 2: Comparação entre a eficácia dos tratamentos T3 e T4 frente aos controles CP e CN, na redução da aderência bacteriana a superfície do casco bovino em relação à elevação da concentração de matéria orgânica no líquido de banho. Simulação em pedilúvio de bancada.

	CN	CP	T3 (<i>Thymus vulgaris</i>)	T4 (<i>Acacia mearnsii</i>)
O % (MO)	3,46 ^{a*}	3,11 ^{b*}	2,90 ^{b*}	4,44 ^{c*}
3,46% (MO)	3,57 ^{a*}	3,29 ^{a*}	3,51 ^{a**}	4,39 ^{b*}
9,93% (MO)	4,17 ^{a**}	4,11 ^{a**}	3,67 ^{a**}	4,74 ^{b*}
34,21% (MO)	3,52 ^{a*}	3,69 ^{a*}	4,63 ^{b***}	4,65 ^{b*}

Letras diferentes na mesma linha - valores que diferiram estatisticamente. Números diferentes de * na mesma coluna - valores que diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$).

Em relação ao T4 os valores de UFC foram maiores do que o CN ($p < 0,0001$), porém também foram menores do que nos fragmentos que não receberam tratamento algum ($p < 0,0001$), o que demonstra que houve redução na formação de biofilmes, porém de forma menos eficiente do que com a água apenas.

Foi a primeira vez que em que taninos derivados da acácia negra foram testados em pedilúvios. As contagens bacterianas entre 3,46% e 9,93% de matéria orgânica em líquido de banho ficaram entre 1,85 a 2,27 Log UFC/ml se comparados ao T3 (1,14 a 1,69 Log UFC/ml). Apenas o T3 demonstrou potencial de controle bacteriano semelhante as soluções de óxido de zinco, polihexametileno biguanida e associações de cal (5%) com polihexametileno biguanida as quais apresentaram valores na ordem de 10^3 (1 Log) UFC/ ml (Cunha et al 2002). Não foi mencionada a

concentração de matéria orgânica no líquido de banho nestes estudos o que dificulta uma comparação mais aprofundada.

Um experimento realizado com *Stryphnodendron adstringens*, (20% de taninos), demonstrou efeito benéfico do tratamento sobre a cicatrização de ferida cirúrgica de DDB (Silva et al., 2015). Os taninos apresentam a capacidade de complexação de metais, proteínas e polissacarídeos levando a formação de uma espécie de película que gera um ambiente no qual o processo de cicatrização é beneficiado e a atividade antibacteriana é evidenciada (Haslan, 1996; Smith et al., 2003). Tais fatores podem eventualmente ser considerados como benéficos aos tratamentos de afecções podais, e por isso avaliações diretas nos animais foram realizadas.

Em relação aos testes com bovinos, ambas as substâncias não demonstraram efeito colateral visível, após a exposição ao tratamento de vacas saudáveis figura 3



Figura 2: Acompanhamento fotográfico antes, fotos acima, e depois (fotos abaixo) do membro posterior direito de um dos animais submetidos ao tratamento em pedilúvio a base de *Acacia mearnsii* 15%. Notar o forte tingimento do pelo provocado pelo tratamento, não se observou nenhuma reação adversa e nem comportamental no período avaliado.

Conclusão

Concluimos que os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e de *Eucalyptus globulus* nas concentrações usadas não inibem a proliferação bacteriana em pedilúvio de bancada. Os taninos derivados de *Acacia mearnsii* mesmo passando pelos testes de triagem não foram efetivos em controlar as populações bacterianas presentes no líquido de banho e nem capazes de reduzir a formação de biofilmes. O óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris*) na concentração usada se mostrou efetivo em controlar a proliferação bacteriana no líquido de banho. Quanto aos fragmentos de casco bovinos a capacidade de redução da aderência de biofilmes foi perdida quando da adição de matéria orgânica sendo que nenhum

tratamento, nem mesmo o CP foi capaz de, na média, ser superior ao CN. Os tratamentos CP e T3 tem efeito sobre células plânctônicas e pouco efeito sobre biofilmes. Não foram observadas reações adversas quanto ao uso de *Thymus vulgaris* e *Acacia mearnsii* em pedilúvios de campo. É necessária a realização de estudos clínicos mais aprofundados para averiguar seus efeitos sobre algumas doenças podais específicas bem como possíveis associações.

Agradecemos a Fundação Araucária pelo apoio financeiro ao projeto e a PUCPR pelo apoio financeiro através da bolsa Marcelino Champagnat.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO:

Desenvolveu-se um modelo de pedilúvio de bancada VacaPed[®] que pode ser utilizado para a triagem de substâncias com potencial a serem utilizadas em pedilúvios de campo, com a vantagem de acelerar o processo de busca e reduzir os custos. Aprimoramentos são necessários para se simular outras variáveis como sólidos dissolvidos, e se avaliar também o efeito do material de construção dos pedilúvios de campo sobre o controle bacteriano. Concluímos que os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e de *Eucalyptus globulus* não apresentam capacidade de inibição da proliferação bacteriana no pedilúvio VacaPed[®] nas doses economicamente equiparáveis aos tratamentos habituais com CuSO₄ 2% + Formaldeído 3%. O óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris*) na concentração usada se mostrou efetivo em controlar a proliferação bacteriana no líquido de banho. Quanto aos fragmentos de casco bovinos a capacidade de redução da aderência de biofilmes foi perdida quando da adição de matéria orgânica sendo que nenhum tratamento, nem mesmo o CP foi capaz de, na média, ser superior ao CN. Os tratamentos CP e T3 tem efeito sobre células plânctônicas e pouco efeito sobre biofilmes. Não foram observadas reações adversas quanto ao uso de *Thymus vulgaris* e *Acacia mearnsii* em pedilúvios de campo.

REFERÊNCIAS

- Alcides JS, Tatiane TS, Carlos MA, Marcos CO, Diomedes DJ. Afecções podais em vacas da bacia leiteira de Rondon do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009; 29: 905-909.
- Acheson ED, Gardner MJ, Pannet B, Barnes HR, Osmond C, Taylor CP. Formaldehyde in the British chemical industry. *The Lancet*. 1984; 611-616.
- Arkins S, Hannan J, Sherington J. Effects of formaldehyde foot bathing on foot disease and claw quality in dairy cows. *Veterinary Record*. 1986; 118: 580-583.
- Aust MO, Godlinski, F, Travis GR, Hao X, Mcallister TA, Leinweber P, Bruhn SRT. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environmental Pollution*. 2008; 156:1243–1251
- Bergsten C, Hultgren J, Hillström A. Using a footbath with cooper sulfate or peracetic acid foam for the control of digital dermatitis and hell horn erosion in a dairy herd. 14th. International Symposium and 6th. Conference on Lameness in Ruminants. 2006.
- Blowey RW, Weaver AD. *A Colour Atlas of Diseases and Disorders of Cattle*. 2nd Edition; UK; Mosby. 2003.
- Blowey RW, Chesterton N. Effect of footbath width on faecal contamination by cattle. *Veterinary Record*. 2012; 170: 628-628.
- Blowey RW, A clinical case report of death from ingestion of formalin foot bath solution. Proceedings of the 17th. International Symposium and 9th International Conference on Lameness in Ruminants. August 2013; 177-177. Bristol, UK.
- Borderas TF, Pawluczuk B, Passille AM, Rushen J. Claw Hardness of Dairy Cows: Relationship to Water Content and Claw Lesions. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87:2085–2093.
- Bouyer J, Stachurski F, Gouro AS, Lancelot R. Control of bovine trypanosomosis by restriction application insecticides to cattle using footbaths. *Veterinary Parasitology*. 2009.160:187–193.
- Bouyer J, Stachurski F, Kabore I, Bauer B, Lancelot R. *Tse tse* control in cattle from pyrethroid footbaths. *Preventive Veterinary Medicine*. 2007; 78: 223–238.
- Buchalova M, Skender A, Patel I, Time and soil interaction in the germicidal efficacy of 4hooves™. Proceedings of the 17th. International Symposium and 9th. International Conference on Lameness in Ruminants. August 2013; 226-227. Bristol, UK.
- Caldefie FC, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP, Guillot j. Potential Anti-inflammatory Effects of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil on Human Peripheral Blood Leukocytes. *Phytotherapy Research*. 2006:364–370.

Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Bacteriology. 1995; 78: 264-269.

Carson CF, Riley TV, Cookson BD. Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. Journal of Hospital Infection. 1998; 40: 175-178.

Carson CG, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clinical microbiology reviews. 2006; 50-62.

Cha E, Hertl JA, Barb D, Gröhn A. The cost of different types of lameness in dairy cows calculated by dynamic programming. Preventive Veterinary Medicine. 2010; 97:1-8.

Cook NB, Riemam J, Gomez A, Burgi K. Observations on the design and use of footbaths for the control of infectious diseases in dairy cattle. Veterinary Journal. 2012; 193: 669-673.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology. 2000.88:170-175.

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO N° 375 , DE 29 DE AGOSTO DE 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Disponível em:
< <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>>.

Cruz C, Driemeier D, Cerva C, Corbellini LG. Clinical and epidemiological aspects of bovine digital lesions in southern Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2001; 53: 654-657.

Cruz R, Garcia D, Alvarado MM, Jimenez U, Pino D. Estudio radiológico de lesiones podales en El bovino a nivel de campo. Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal. 2001; 5: 604-606.

Cunha PHJ, Silva LAF, Mesquita AJ, Borges NC, Fioravente MCS, Moraes RR, Santana AP. Avaliação da estabilidade do cloridrato de polihexametileno biguanida em pedilúvio para bovinos. Ciência Animal Brasileira. 2001; 1:41-50.

Cunha PHJ, Silva LAF, Fioravanti MCS, Borges NC, Moraes RR, Santana AP. Avaliação físico-química e microbiológica de diversas soluções desinfetantes utilizadas em pedilúvios para bovinos. ARS Veterinária. 2002; 2:130-136.

Doane M, Sarenbo S. Exposure of farmer laborers and dairy cattle to formaldehyde from footbath use at a dairy farm of New York State. Science of the Total Environment. 2014; 487: 65-71.

Döpfer D, Dandurand D, Desrochers A, Letellier A, Quessy S, Bourgeois A, Frenette. Comparison of hoof bath solutions for the prevention and control of digital dermatitis

in dairy cows C, Allard DM. Proceedings of the 17th. International Symposium and 9th. International Conference on Lameness in Ruminants. August 2013; 228-229. Bristol, UK.

Dirksen G, Gründer HG, Stöber M. Exame Clínico dos Bovinos. Guanabara. Brasil 1993, 420p.

Duan W, Ohara S, Hashida K, Makino R. Condensed tannins from steamed *Acacia mearnsii* bark. *Holzforschung*, 2005, 59: 289–294.

Dyson S, Armstrong T, Allen T, Allen N, Davies A, Bell NJ. Suspected chemical burn on the digital skin of dairy cows following foot bathing with 5% formalin solution. Proceedings of the 17th. International Symposium and 9th. International Conference on Lameness in Ruminants. August 2013; 211-211. Bristol, UK.

European Commission, 2003a. Commission Regulation (EC) No 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of activities in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Official Journal of European Communities* L187, 11.

European Commission, 2003b. Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) — Reference Document on Best Available Techniques for Intensive Rearing of Poultry and Pigs, Seville, Spain EU. Commission Regulation (EC) No 1451/2007. Council of the European Union: *Official Journal of the European Union* 2007.

Epperson B, Midla L. Copper Sulfate for Footbaths - Issues and Alternatives. Tri-State Dairy Nutrition Conference. 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Databases. Agriculture. 2014. Disponível em :< <http://faostat.fao.org/site/377/DesktopDefault.aspx?PageID=377#ancor>>

Fang J, Li DH, Yu XQ, Lv MQ, Bai LZ, Du LZ, Zhou DX. Formaldehyde exposure inhibits the expression of mammalian target of rapamycin in rat testis. *Toxicology and industrial health*. 2015:1-9.

Fjeldaas T, Poindecker MK, Bøe KE , Larssen RB. Water footbath, automatic flushing, and disinfection to improve the health of bovine feet. *Journal of Dairy Science*. 2014; 97:2835–2846.

Flemming CA, Trevors JT. Copper toxicity and chemistry in the environment a review. *Water, Air, and Soil Pollution*. 1989.44:143-158.

Gonçalves GMS; Bottaro M, Nilson AC. Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*. *Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada*. 2011; 32:375-380.

Gregory NG. Swelling of cattle hell horn by urine. *Australian veterinary journal*. 2004; 82: 161-163

Grongnet JF, Roignant M, Serieys F. Le choix des antiseptiques pour les pédiluves destinés aux bovins. *Recherche Vétérinaire*.1981; 12: 129-132

Haslan E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *Journal of Natural Products*.1996; 59: 205-215.

Howard CS. Determination of Total Dissolved Solids in Water Analysis. U. S. Geological Survey, Department of the Interior, Washington, D.C. *Industrial Engineering Chemical Analyses*.1933;1:4-6.

Higuchi H, Kurumado H, Mori M, Degawa A, Fujisawa H, Kuwano A, Nagahata H. Effects of ammonia and hydrogen sulfide on physical and biochemical properties of the claw horn of Holstein cows. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2009;73:15–20

Holzhauser M, Sampimon OC. Concentration of formalin in walk through footbaths used by dairy herds. *Veterinary Record*. 2004; 154: 755-756

Holzhauser M, Bartels CJM, Döpfer D, Shaik GV. Clinical course of digital dermatitis lesions in an endemically infected herd without preventive herd strategies. *Journal of Dairy Science*. 2008a; 177:222-230.

Holzhauser M, Döpfer D, Boer J, Schaik GV. Effects of different intervention strategies on the incidence of papillomatous digital dermatitis in dairy cows. *Veterinary Record*. 2008b; 162: 41-46.

Holzhauser M, Crhis JB, Cristher B, Miriam MJ, Riet V, Frankena K, Lam TJGM. The effect of an acidified, ionized copper sulphate solution on digital dermatitis in dairy cows. *The Veterinary Journal*. 2012; 193: 607-706.

Hoffman A. Footbaths for the Treatment or Control of Hairy Heel Warts (Digital Dermatitis) in Dairy Herds: Summary of Seven Studies. Washington state university. *Veterinary medicine extension*. 2012. Disponible em: <http://vetextension.wsu.edu/wp-content/uploads/sites/8/2015/03/Footbaths20122.pdf>>

Hirst WM, Fevre AML, Logue DN, Offer JE, Chaplin SJ, Murray RD, Ward WR, French NP. A systematic compilation and classification of the literature on lameness in cattle. *The Veterinary Journal*. 2002; 164: 7-19.

Hoshino, N., T. Kimura, F. Hayakawa, A. Yamaji, T. Ando. Bactericidal activity of catechin-copper (II) complexes against *Staphylococcus aureus* compared with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*.2000; 31: 213 – 217

Jack DT. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Archives of Environmental Health*.2001.56: 300-311.

Juergens UR, Stober M, Vetter H: Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. *European Journal Medical Research*. 1998; 3:508-510.

Juergens UR, Stober M, Schmidt-Schilling L, Kleuver T, Vetter H: Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes *ex vivo*. *European Journal Medical Research*. 1998, 3:407-412.

Juergens UR, Dethlefsen U, Steinkamp G, Gillissen A, Reppes R, Vetter H: Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*. 2003, 97:250.

Kulow MJ, Cardona M, Elliot S, Dahm J, Lopez Benavides MG, Buchalova M, Mateus C, Hemlig TC, Döpfer D. In vitro adhesion assays challenged by 16 candidate chemicals for bovine hoof baths to prevent and control digital dermatitis in cattle. Proceedings of the 17th. International Symposium and 9th. International Conference on Lameness in Ruminants. August 2013; 188-189. Bristol, UK.

Kulow M, Zibae F, Allard M, Döpfer D. Short communication: Determination of the ability of Thymox[®] to kill or inhibit various species of microorganisms associated with infectious causes of bovine lameness in vitro. *Journal of Dairy Science*. 2015. 8:1–7

Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial. *Environmental Ecological indicators*: 2008.8:1–13

Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. Carcinogenicity of Formaldehyde in Rats and Mice after Long-Term Inhalation Exposure. *CANCER RESEARCH*.1983;43:4382-4392

Kozen EA. Manejo e utilização de esterco de bovinos. Comunicado Técnico n° 14 EMBRAPA- MAPA. 1999. Disponível em :<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/472255/1/ct14.pdf>>

Laven RA, Logue DN. Treatment strategies for digital dermatitis for the UK. *Veterinary Journal*. 2006; 171: 79-88.

Laven RA, Hunt H. Evaluation of copper sulphate, formalin and peracetic acid in footbaths for the treatment of digital dermatitis in cattle. *Veterinary Record*. 2002. 151:144-146.

Laven RA, Proven MJ. Use of an antibiotic footbath in the treatment of bovine digital dermatitis. *Veterinary Record*.2000.147: 503-506.

Leão MA, Fioravanti MCS, Silva OC, Serafim J, Moura MI, Caetano LB, Eurides D, Silva LCAF. Dermatite digital bovina: resposta terapêutica e custo dos protocolos adotados em duas propriedades rurais. *Revista brasileira de Ciência Veterinária*. 2008.3:111-116.

Lipinski LC, Wouk AFPF, da Silva NL, Perotto D, Ollhoff RD. Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. *African Journal of traditional and complementary alternative medicine*. 2012. 9(4): 542-547.

Losinger WC. Economic impact of reduced milk production associated with papillomatous digital dermatitis in the USA. *Journal of Dairy Research*. 2006; 73: 244-256.

Logue DN, Parkin GT, Taylor TDJ. A field evaluation of a footbath solution for the control digital dermatitis in cattle. *The Veterinary Journal*. 2012; 193: 664-668.

Manske T, Hultgren J, Bergsten C. Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel horn erosion in a Swedish dairy herd. *Preventive Veterinary Medicine*. 2002.53:215-231.

Millezi AF, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013; 44:73-80.

MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento -PNCRC- Programa nacional de controle de resíduos e contaminantes. 2015. Disponível em :< <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>

Mark JH, Heinz GS. Side Effects of 58 Years of Copper Sulfate Treatment of the Fairmont Lakes Minnesota. *Water Resources Bulletin American water*. 1984 (20)6:889-900.

Meinelt T, Pietrock M, Burnison K, Steinberg C. Formaldehyde toxicity is altered by calcium and organic matter. *Journal Applied Ichthyology*. 2005. 21:121–124.

Miller GY, Dorn CR. Costs of Dairy cattle diseases to producers in Ohio. *Preventive Veterinary Medicine*. 1990; 8: 171-182.

Molina LR, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira VCP. Prevalence and classification of foot problems in lactating dairy cows in Belo Horizonte, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 1999; 51: 149-152.

Morris MJ, Kaneko K, Walker SL, Jones DN, Routly JE, Smith RF, Dobson H. Influence of lameness on follicular growth, ovulation, reproductive hormone concentrations and estrus behavior in dairy cows. *Theriogenology*. 2011.76: 658-668.

Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical Biology*. 2011. 49: 893–899

Ndeledje N, Bouyer J, Stachurski F, Grimaud P, Belem AMG, Mbaïndingatloum FM, Bengaly Z, Alfaroukh IO, Cecchi G, Lancelot R. Treating cattle to protect people? Impact of footbath insecticide treatment on Tsetse density in Chad. *PLOS ONE*. 2013. 8:1-10.

Nowrouzian I, Zareii S. Comparison of two application forms of lincomycin-HCl for group treatment of digital dermatitis in dairy cows. *Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness in Ruminants*. Lucerne, Switzerland, September 7 to 10, 1998. pp 287- 289.

Nowrouzian I, Javad KS, Preventive effects of footbath on lameness: use, misuse and abuse. 12th international Symposium on lameness in ruminants. 2002; Orlando, Florida, USA.

Nunes LNSA, Oliveira PS, Charone S, Buzalaf MAR, Ribeiro SMM. Estudo "in situ" da Superfície de Dentes Bovinos após Exposição por Medicamento Fitoterápico. Pesquisa Brasileira Odontopediatria Clinica Integrada. 2012;12:07-9.

Nuss K. Footbaths: The solution to digital dermatitis? The Veterinary Journal. 2006: 11–13

Ollhoff RD, Debas ARB. Is Brazil Getting Lame? Causes of lameness in cattle in Brazil and Perspectives. 18th International Symposium, 10th International Conference on Lameness in Ruminants- Valdivia- Chile. 2015.

Ossent P, Lischer, Ch. Post mortem examination of the hooves of cattle, horses, pigs and small ruminants under practice conditions. In Practice. 1997; 19:21-29.

Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossato M, Rotta LD, Pulletti GF, Serafine LA. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande Do Sul. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2003; 17: 17-22.

Petersen SO, Sommer SG, Béline F, Burton C, Dach J, Dourmad JY, Leip A, Misselbrook F, Nicholson F, Poulsen HF, Provolò G, Sørensen P, Vinnerås B, Weiske A, Berna MP, Böhm R, Juhász C, Mihelic R. Recycling of livestock manure in a whole-farm perspective. Livestock Science. 2007. 112: 180–191.

Phyllis K. Weber S, Lawrence KD, Effects of Total Dissolved Solids on Aquatic Organisms: A Review of Literature and Recommendation for Salmonid Species. American Journal of Environmental Sciences. 2007. 3 (1): 1-6.

Randhawa SS, Dua K, Dhaliwal PS, Uppal SK, Singh ST. Effect of formalin footbathing on the prevalence of foot lesions and conformational indices in dairy cattle. Veterinary Record. 2008. 163: 335-337.

Rebhum WC, Payne RM, King JM, Wolfe M, Begg SN. Interdigital papillomatosis in dairy cattle. Journal of American Veterinary Medical Association. 1980; 177:437-440.

Ribeiro PN, Borges JLJ, Ronconi MA, Marsico Filho F, Pitombo CA. Incidência de afecções podais tidos no Rio de Janeiro. Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. 1992; 15: 28-33.

SAE- Secretaria de Assuntos Estratégicos Brasil 2014. Disponível em http://www,sae.gov.br/site/?page_id-11515

Serafino AL, Vallebona PS, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, Rasi G, Garaci E, Pierimarchi P. Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. BMC immunology. 2008: 9-17.

Shearer JK, Hernandez J. Efficacy of two modified nonantibiotic formulations (Victory) for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.2000; 83:741–745.

Silva LAF, Silva CA, Borges JRJ, Fioravanti MCS, Borges GT, Atayde IB. A clinical trial to assess the use of sodium hypochlorite and oxytetracycline on the healing of digital dermatitis lesions in cattle. *Canadian Veterinary Journal*.2005;46: 345-348
Silva LAF, Coelho KO, Damasceno AD, Nicolau ES, Andrade MA, Fioravanti MCS; Mesquita AJ, Barbosa VT, Moura MI. Avaliação da concentração e do efeito sanitizante do hipoclorito de sódio em pedilúvio para bovinos. *Semina: Ciências Agrárias*. 2007; 28: 89-96.

Silva LAF; Vulcani VAC; Rabelo RE; Mendes FF; Freitas SLR; Silva JA. The effect of topical application of *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville extract and oral biotin supplementation on recovery of wounds from digital dermatitis surgery. *Semina Ciências Agrárias*.2015.36:1955-1964.

Smith AH, Imlay JA, Mackie RL. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Applied and environmental microbiology*. 2003: 3406–341.

Smith AC, Wood CL, McQuerry KJ, Bewley JM. Effect of a tea tree oil and organic acid footbath solution on digital dermatitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.2014.97 :2498–2501.

Souza RC, de Carvalho AU, Ferreira PM, Filho EJF, Ferreira MG, Ferreira RG, Oliveira C, Mourthe AN. Prevalência e distribuição de afecções digitais em vacas leiteiras nas regiões de Belo Horizonte e Pedro Leopoldo. *Ciência Animal Brasileira*. 2007; 4: 823-831.

Speijers MHM, Baird LG, Finney , McBride J , Kilpatrick DJ , Logue DN, O'Connell NE. Effectiveness of different footbath solutions in the treatment of digital dermatitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93: 5782–5791.

Stachurski F, Lancelot R. Footbath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. *Medical and Veterinary Entomology*.2006; 20: 402–412.

Steiger, A. Desinfektion. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1986, 464p.

Teixeira AGV, Machado VS, Caixeta LS, Pereira RV, Bicalho RC. Efficacy of formalin, copper sulfate, and a commercial footbath product in the control of digital dermatitis. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93: 3628–3634

Tomasella TE; Negri Filho LC, Affonso MZ, Junior FB, da Silva LC, Okano W. Prevalência e classificações de lesões podais em bovinos leiteiros na região de Belo Horizonte-MG. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2014; 8: 115 – 128.

Tohidpour A, Sattari M, Omidibaigi R, Yadegar A, Nazemi J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*.2010.17: 42–145.

Thomsen PT, Sørensen JT, Ersbøll AK. Evaluation of three commercial hoof-care products used in footbaths in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 2008; 91:1361–1365.

Trasher JD, Kilburn KH. Embryo Toxicity and Teratogenicity of Formaldehyde. *Archives of Environmental Health*.2001.

Vigo E, Cepeda A, Gualilloand O, Fernandez RP. In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris* nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2004: 257-263.

ZEMPLJIC, B. Influence of footbathing on prevalence of digital dermatitis after introduction of diseased animals into a healthy dairy herd. Proceedings of the 13th. International Symposium and the 5th. Conference on Lameness in Ruminants. Maribor, Slovenia, February 11 to 15, 2004. Pp 145-147.

William DK, Kenneth LP, David JD, Edward JG, James AS. Carcinogenicity of Formaldehyde in Rats and Mice after Long-Term Inhalation Exposure. *Cancer Research*.1983; 43: 4382-4392.

Wright IA, Davies PJ, Findlay SJ, Jonasson OJ. A new type of water pollution: concrete drainage infrastructure and geochemical contamination of urban Waters. *Marine and Freshwater Research*. 2011; 62:1355–1361.

ANEXO A

Algoritimos de proGramação do Servo motor TRAXXAS 2018®, IDE ARDUINO:

```
include <LiquidCrystal.h>
#include <Servo.h>

#include <EEPROM.h>
Servo myservo;

LiquidCrystal lcd(12, 13, A2, A3, A4, A5);

int led = 0;

int pos = 0;

int aDDBr=0;

int repet = 0;

int amplitude=0;

byte cycle;
int analogPin=A0;
void setup()

{

  pinMode(led, OUTPUT);
  pinMode(13, OUTPUT);
  pinMode(12, OUTPUT);
  pinMode(A2, OUTPUT);
  pinMode(A3, OUTPUT);
  pinMode(A4, OUTPUT);
  pinMode(A5, OUTPUT);

  // attachInterrupt(1,amp,RISING);
  myservo.attach(5);
  lcd.begin(16, 2);
  lcd.clear( );

  //pinMode(motor1Pin , INPUT);

  lcd.setCursor(0,1);

  lcd.print("Setup OK!");
```

```
definir();}
```

```
void definir()
```

```
{  
  delay(200);  
  lcd.clear();  
  lcd.setCursor(0,1);//coluna,linha  
  lcd.print("Ult.rep:");  
  lcd.setCursor(9,1);  
  cycle = EEPROM.read(0);  
  lcd.print(cycle,DEC);  
  delay(2000);  
}
```

```
}  
//-----  
void loop() {  
  lcd.clear();  
  lcd.setCursor(0,1);  
  lcd.print(repet);  
  amplitude = analogRead(analogPin);  
  amplitude = amplitude/6;  
  for(pos = 0; pos <= amplitude; pos += 1) // goes from 0 degrees to 180 degrees  
  {  
    // in steps of 1 degree  
    digitalWrite(led,HIGH);  
    myservo.write(pos); // tell servo to go to position in variable 'pos'  
    delay(20); // waits 15ms for the servo to reach the position  
  }  
  for(pos = amplitude ; pos>=0; pos-=1) // goes from 180 degrees to 0 degrees  
  {  
    digitalWrite(led,LOW);  
    myservo.write(pos); // tell servo to go to position in variable 'pos'  
    delay(20); // waits 15ms for the servo to reach the position  
  }  
  repet++;  
  EEPROM.write(aDDBr, repet);  
}
```

ANEXO B

Especificações técnicas dos produtos utilizados como tratamento

<i>Acacia mearnsii</i>	Especificações
Tanantes	72,5 % (mínimo)
Não tanantes	26,5 % (máximo)
Insolúveis	1% máximo
Umidade	7%
pH	4,3- 4,7
<i>Melaleuca Alternifolia</i>	Especificações
Aparência	Líquido límpido
Cor	Incolor a Amarelo Claro
Odor	Característico
Impurezas	Isento
Densidade (20°C)	0,885 - 0,906
Índice de Refração (20°C)	1,470 – 1,482
Principais Componentes	Terpinen-4-ol = 42%; Gama Terpinene = 23%; Alpha Terpinene = 11%; Cineol = 2%
<i>Eucalyptus Globulus</i>	Especificações
Aparência	Líquido límpido
Cor	Incolor a Amarelo Palha
Impurezas	Isento
Odor	Fresco, canforado, típico
Densidade (20°C)	0,905 – 0,930
Índice de Refração (20°C)	1,450 – 1,470
Rotação Ótica	[0°; +10°]
Principais componentes	1,8 Cineol = 81 %; Limonene = 9.1 %, Alpha pinene = 2.7 %.
<i>Thymus vulgaris</i>	Especificações
Aparência Impurezas Isento	Líquido Límpido Incolor a Amarelo Claro
Odor	Característico
Impurezas	Isento
Densidade (20oC)	0,890 – 0,930
Índice de Refração (20oC)	1,490 – 1,510
Principal componente	Timol