

EFEITO DA APLICAÇÃO INTRAMAMÁRIA DE PRÓPOLIS SOBRE A COMPOSIÇÃO DO LEITE E A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

PEREIRA, L. S. ^{*1}; BOTTEON, R. C. C. M. ²

Introdução

Nas últimas décadas se evidenciou um notável avanço nos conhecimentos acerca da composição e atividade biológica e farmacológica da própolis reforçando o interesse dos cientistas sobre suas propriedades preventivas e curativas.

A própolis é uma substância resinosa cuja composição química agrega basicamente, resinas e bálsamos aromáticos, ceras, óleos essenciais e grãos de pólen, além de flavonóides, ácidos fenólicos, minerais e vitaminas. Entre as substâncias isoladas, preponderam os flavonóides, como um dos principais responsáveis por sua atividade farmacológica (HAVSTEEN, 2002). Além dos flavonóides diversos outros compostos têm sido relacionados às propriedades alimentícias, curativas e profiláticas da própolis. Os flavonóides atuam em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização e como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana, anestésica, antiparasitária, antiinflamatória e imunomoduladora (WILLIAMS et al., 2004; AWALE et al., 2005; MENEZES, 2005).

Em medicina Veterinária a própolis tem demonstrado resultados satisfatórios, tanto na prevenção, como no tratamento de doenças (MIROLYUBOV & BARSKOV, 1980; LANGONI et al., 1996; SANTOS et al., 1999; SILVA SOBRINHO et al., 2004). Estudos recentes confirmam a ação antibacteriana “*in vitro*” contra diferentes gêneros de bactérias (PINTO et al., 2001; VARGAS et al., 2004; BARROS et al., 2007; SILVA et al., 2008). MIROLYUBOV & BARSKOV (1980) e MERESTA et al. (1989) relataram que a própolis foi efetiva na terapia da mastite causada por microrganismos resistentes a antibióticos convencionais.

Um dos grandes desafios atuais é produzir alimentos de forma ecologicamente sustentável e sem contaminantes. O sistema orgânico de produção não é caracterizado somente pela troca de insumos químicos por insumos orgânicos, biológicos e ecológicos, ele deve atender a normas específicas para a produção orgânica. Neste contexto a produção orgânica de leite prioriza o bem-estar animal e os métodos alternativos de combate às enfermidades, sendo obrigatórias as vacinas previstas na legislação.

O controle das mastites, independentemente do medicamento utilizado, deve ser sempre acompanhado das medidas preventivas usuais de forma a garantir a eficácia do tratamento. Embora, em muitos casos, ainda careçam de comprovação científica há uma série de medidas curativas prescritas como tratamento alternativo aos antibióticos.

Uma vez que a ação *in vitro* da própolis sobre bactérias causadoras da mastite já foi comprovada, neste trabalho objetivamos avaliar o efeito da aplicação intramamária de extrato alcoólico de própolis sobre a CCS e os principais constituintes do leite de vacas sadias.

Material e Métodos:

Foram avaliados 18 quartos mamários de cinco vacas mestiças de diferentes idades e níveis de produção, de um sistema de produção orgânica em Seropédica - RJ, com uma ordenha diária, com bezerro ao pé. Nesta propriedade a solução alcoólica de própolis diluída em glicerina vinha sendo utilizada rotineiramente para tratamento de mastite clínica e ocasionalmente em vacas com reação ao CMT, com resultados não comprovados e sem qualquer avaliação mais rigorosa.

No início da ordenha foram realizados os testes da caneca de fundo escuro para detecção dos quartos mamários com mastite clínica, utilizando-se os primeiros jatos de leite e imediatamente após a preparação higiênica do úbere foi realizado o Califórnia Mastitis Test (CMT) para identificação de mastite subclínica. De cada quarto mamário foi coletada uma amostra de 2,0 mL de leite à qual foi adicionado, na mesma proporção, um detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio). Após homogeneização por alguns segundos, o resultado foi dado através do grau de viscosidade avaliado em 5 escores: negativo (-), suspeito (traços), fracamente positivo (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++) segundo SCHALM & NOORLANDER (1957). Animais com mastite clínica e com escore ++ e +++ ao CMT foram descartados e cinco animais com reações negativas ou fracas (+) foram utilizados neste estudo.

Pela manhã (Dia 1) as vacas foram ordenhadas manualmente, obtendo-se individualmente o leite total de cada quarto em baldes de aço inoxidável previamente higienizados. Após homogeneização retirou-se com auxílio de um coletor de aço inoxidável uma amostra de 100 ml de leite de cada quarto.

Uma alíquota de cada amostra foi acondicionada em frascos contendo uma pastilha de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) na concentração de 8mg do ingrediente ativo para cada 40ml da amostra. O frasco foi homogeneizado por inversão até completa dissolução do comprimido. As amostras foram mantidas em temperatura aproximada de 4 °C e encaminhadas em até 48 horas, por SEDEX ao Laboratório da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz da Universidade de São Paulo, em caixas térmicas contendo gelo, onde foram analisadas quanto aos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) e Contagem de Células Somáticas (CCS) por métodos de referência.

Após a obtenção das amostras (Dia 1), diluiu-se 125 gotas de extrato alcoólico de própolis comercial em 100 mL de glicerina líquida, inoculando-se com auxílio de sonda estéril, 10 mL por via intra-mamária em 18 quartos mamários de cinco vacas. Esse procedimento foi repetido no dia seguinte. No terceiro dia realizou-se novamente o CMT e procedeu-se uma nova coleta de amostras de leite conforme descrito anteriormente.

Os dados relativos aos valores de gordura, proteína, lactose, ST e ESD nos dias 1 e 3, respectivamente antes e após a inoculação do própolis foram analisados através do teste T.

Resultados e Discussão:

O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas e outros elementos sólidos, que se encontram suspensos em água e constituem o parâmetro de composição que define a qualidade do leite. Os principais fatores relacionados com a alteração dos componentes do leite são as lesões das células secretoras, que podem resultar em alterações da concentração de lactose, proteína e gordura, e aumento da permeabilidade

vascular, que determina o aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas séricas (STEFFERT, 1993).

Observou-se nesse estudo uma marcante alteração na composição do leite com diminuição dos teores de gordura, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado entre quartos mamários individualmente (Tabela 1). Todas as vacas e respectivos quartos mamários apresentaram após a aplicação do própolis, um aumento na intensidade da reação observada ao CMT, comprovado pelo aumento significativo das células somáticas porém nenhum dos quartos apresentou reação característica de mastite clínica.

A CCS tem sido utilizada como ferramenta para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária, e como indicador das medidas de higiene no sistema de produção de leite sinalizando para possíveis perdas econômicas (SANTOS, 2002).

Embora os valores indicativos de normalidade não sejam consenso entre os autores, as contagens iniciais (média de 244 mil células/mL) em conjunto com os dados do CMT atestam a sanidade dos quartos avaliados uma vez que o leite obtido de quartos mamários de animais sadios contém de 50 a 250 mil células/mL (KITCHEN, 1981). Após o tratamento com própolis, as CCS aumentaram em todos os quartos avaliados (em média 1.167.000 células/mL), com diferença significativa entre os tempos ($p=0,004192$). Como a variância foi muito grande e os dados não representavam uma curva normal, as CCS foram transformadas em log de CS e analisadas estatisticamente em relação aos diferentes momentos. Os valores de log antes ($1,77 \pm 0,84$) e após a aplicação do produto ($2,86 \pm 0,19$) diferiram significativamente a um grau de confiança de 99% pelo teste T ($p=3,8E-08$).

A infecção na glândula mamária provoca a liberação de substâncias químicas e destruição de tecido secretor, o que induz a passagem de células de defesa do sangue para o interior da glândula (PHILPOT & NICKERSON, 1991; HARMON, 1994). Assim, a intensa migração de células somáticas para o leite após a aplicação intramamária do própolis evidencia uma reação inflamatória local, provavelmente desencadeada pela ação irritativa do álcool ou mesmo do própolis, uma vez que a glicerina possui ação irritante mínima, o que permite sua utilização como método de conservação para diferentes tecidos animais (LEITE et al., 1979).

Quanto a composição a proteína variou pouco - em média de 3,46% para 3,44%, concordando com dados obtidos por outros autores que atestam pequenas variações na porcentagem de proteína total do leite em decorrência da mastite. O fato se justifica pelo aumento das proteínas séricas (albumina e imunoglobulinas) compensatoriamente ao decréscimo das proteínas sintetizadas na glândula mamária (a e β caseína, a-lactoalbumina e β -lactoglobulina) (KITCHEN, 1981).

Uma alteração importante causada pela mastite subclínica é a redução da capacidade de síntese de lactose pelo epitélio glandular cuja diminuição resulta na redução da produção de leite devido ao papel central da lactose como regulador osmótico do volume de leite (GONZALES et al., 2001). Neste estudo a lactose variou de 4,45% para 3,23 antes e após a aplicação do própolis, respectivamente. Essa variação é também justificada pela mastite confirmada pelo aumento de CCS, concordando com resultados de CUNHA et al. (2008) que observaram redução da síntese de lactose pela glândula em

relação ao escore de CCS, além de uma correlação negativa entre CCS e porcentagem de gordura e proteínas.

A literatura revela resultados conflitantes quanto ao efeito da mastite sobre a concentração de gordura do leite. Normalmente existe tendência de queda na concentração de gordura à medida que aumenta a CCS. No entanto as mudanças no nível e composição de gordura decorrentes da mastite são relativamente pequenas a menos que a infecção seja severa. Nos casos em que a produção de leite diminuiu em uma proporção maior que a síntese da gordura, a porcentagem de gordura aumenta em animais com altas CCS em função do efeito da concentração (MÜLLER, 2002). No presente trabalho foi observado teor de gordura abaixo da normalidade desde o início (2,38), sendo atribuído ao leite que provavelmente ficou retido em decorrência do stress provocado pela mudança do manejo por ocasião do experimento. Ainda assim foi constatada uma redução significativa ($p=0,03661$) na concentração de gordura após a aplicação de própolis (de 2,38% para 1,57%), concordando com os dados de HARMON (1994) que atesta que a concentração de gordura no leite com elevada CCS tende a diminuir, e em oposição aos resultados de MACHADO et al. (2000) e CUNHA et al. (2008) que observaram que com o aumento das CCS houve aumento da porcentagem de gordura do leite.

Normalmente o leite tem 87,5% de água e 12,5% de ST, na forma de proteínas, lactose, gordura, sais minerais e outros componentes menores (GONZALES et al., 2001). Possivelmente devido à redução de proteínas, lactose e gordura ocorreu também a redução dos ST (11,07% para 9,06%) e do ESD (8,93% para 7,49%). Estatisticamente a diferença não foi significativa para gordura, lactose, proteínas, ST e ESD antes e após o tratamento.

Conclusão

O extrato alcoólico de própolis induziu a uma reação inflamatória da glândula mamária resultando em alterações na composição do leite e CCS. Embora na agricultura orgânica o uso de produtos naturais seja estimulado, a utilização dos mesmos deve ser regulamentada através de estudos científicos para evitar danos maiores ao bem estar animal e ao sistema de produção.

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão dos valores de gordura (Gor), proteínas (Pro), lactose (Lact), sólidos totais (ST), extrato seco desengordura (ESD) e contagem de células somáticas (CCS) do leite de quartos mamários individuais de cinco vacas antes e após aplicação de extrato alcoólico de própolis intramamária.

Gordura		Proteína		Lactose		ST		ESD		CCS X 1000	
Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia 3
2,38	1,27	3,46	3,44	4,45	3,23	11,07	8,82	8,7	7,5	244	1.167
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
1,47	1,09	0,254	0,22	0,08	0,51	2,7	2,5	0,38	1,04	195	1.053
p=0,03661		p=0,9195		p=0,2511		p=0,0670		p=0,1324		p=0,0041	

Referências bibliográficas

AWALE, S.; SHRESTHA, S.P.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.Y. Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. *Journal of Natural Products*, v.68, n.6, p.858-864, 2005.

BARROS, M.P, SOUSA J.P.B, BASTOS, J.K, ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol*, v.4, n.3, p,567-71, 2007.

CUNHA, R.P.L Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.60 no.1, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras, 1., 2001, Passo Fundo. Anais... Porto Alegre. p. 521, 2001.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, v.96, n.2/3, p.67-202, 2002.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 7, p.2103-2112, 1994.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v.48, n. p.167-188, 1981.

LANGONI, H; DOMINGUES, P. F; FUNARI, S. R. C; CHANDE, C. G; NEVES, I. R. Efeito antimicrobiano in vitro da própolis. Arq. Bras. Med. Vet Zootc, v.48, n.2, p.:227-229, 1996.

LEITE, J.B.F. et al. A glicerina e a preservação dos tecidos. *Revista Paulista de Medicina*, v.93, p.81-84, 1979.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Rev. Bras. Zootec.* v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v.26, n.2, p.83-99, 1995.

MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using an extract of propolis. *Medycyna Weterinaryjna*, v.45, p.392-395, 1989.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, 2005.

MIROLYUBOV, M.G.; BARSKOV, A.A. Propolis for bovine mastitis. *Veterinariya*, n. 2, p. 45-46, 1980.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite Anais do II Sul Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, p.206-217, 2002.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. 1991. Mastitis: counter attack. Babson Bros, Naperville. 150p.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.38, p.278-283, 2001.

SANTOS, I. W. et al. Use of propolis in the treatment of the cow endometritis. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.23, n.3, p.439-441 1999.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.130, n.5, p.199-207, 1957.

SILVA SOBRINHO, A. G. et al. Utilização da própolis no tratamento curativo da pododermite necrótica em ovinos. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/56/propolis.htm>>. Acesso em: 04 ago. 2008.

STEFFERT, I.J. Compositional changes in cows milk associated with health problem. In: *MILK FAT FLAVOUR FORUM*, Palmerston North, New Zealand. *Proceedings...*: New Zealand Dairy Research Institute, 1993. p.119-125.

VARGAS, A. C., LOGUERCIO, A. P., WITT, N.M., COSTA, M. M., VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana "in-vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural* V.34, n.1, 159-163, 2004.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *FreeRadicalBiology and Medicine*, v.36, n.7, p.838-849, 2004.