

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**UTILIZAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO E
VITAMINA E NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO
LEITE BOVINO.**

ANA CAROLINA FABRO ZOCCAL GARCIA

Botucatu – SP
Dezembro - 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**UTILIZAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO E
VITAMINA E NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO
LEITE BOVINO.**

ANA CAROLINA FABRO ZOCCAL GARCIA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador:
Prof.Ass.Dr. Simone Biagio Chiacchio

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Garcia, Ana Carolina Fabro Zoccal.

Utilização da suplementação de zinco orgânico e vitamina E, na contagem de células somáticas do leite bovino / Ana Carolina Fabro Zoccal Garcia. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Simone Biagio Chiacchio

Assunto CAPES: 50502050

1. Leite - Qualidade - Aspectos nutricionais 2. Bovino de Leite
3. Mastite

CDD 636.2.0896

Palavras-chave: Leite; Qualidade; Vaca; Vitamina E; Zinco

Nome do Autor: Ana Carolina Fabro Zoccal Garcia

Título: UTILIZAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO E VITAMINA E NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE BOVINO.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica de Grandes Animais
FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Ass. Dr. Roberto Calderon Gonçalves
Membro
Departamento de Clínica de Grandes Animais
FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof.Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
FMV – UNOPAR – Londrina - PR

Data da Defesa: 21 de Dezembro de 2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que são meu bem maior e a quem agradeço todos os dias pelo exemplo e amor, ou seja, à minha família!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por ter me permitido sonhar e tornar meus sonhos concretos;

Aos meus pais, Luiz Antonio e Silvia Cristina, por estarem ao meu lado sempre com uma palavra de apoio a cada nova empreitada, e pela generosa contribuição de minha mãe ao levantar por várias vezes de madrugada para me acompanhar nas propriedades;

A minha irmã Thereza Cristina, que mesmo longe, sempre me deu força para que não desanimasse e seguisse em frente;

A minha avó Dona Anna, por sua “corujisse” e carinho.

Aos meus tios Elivaldo Queiroz Faria (“*in memorian*”) e Marta, por todo apoio e carinho;

Aos meus primos José Fernando Ardemani e Márcia Giseli Quirino pelo carinho e incentivo;

Ao grande amigo Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio não só pela paciência, amizade e grande contribuição intelectual, mas também por toda confiança depositada em mim, durante estes anos;

Ao Prof. Ass. Dr. Roberto Calderon Gonçalves, pelas sugestões feitas quanto à análise e revisão dos dados e por toda sua atenção, dedicação e carinho;

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni por permitir tão gentilmente que pudéssemos utilizar os laboratórios do núcleo de pesquisa em mastite (NUPEMAS);

Ao Sr. Benedito Menozzi do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública pela realização das contagens eletrônicas de células somáticas;

Ao Prof. Gilson L. Volpato do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu), pela atenção e realização das análises estatísticas deste estudo.

Ao Prof. Flavio Barca do Departamento de Imonogenética da Universidade do Norte do Paraná (UNOPAR), pela atenção e gentileza quanto à realização das análises estatísticas deste estudo.

Ao Dr. Leonardo Dantas da Silva, Médico Veterinário, por nos ter permitido entrar e realizar o estudo na Fazenda Moura, propriedade esta em que presta serviços.

Aos Senhores Marcelo Moura Filho e Marcelo Moura Neto, proprietários da Fazenda Moura, por nos permitir fazer uso de seus animais para realização deste estudo, bem como aos seus funcionários, os senhores Alexandre e Agnaldo Aparecido de Oliveira, pela excepcional ajuda nas coletas;

Aos senhores João Spago, Daniel Spago e senhora Antonia Maria Bruno Spago, proprietários da Fazenda Boa Esperança, por nos cederem seus animais também para realização deste e pela grande ajuda nas coletas;

Aos funcionários da secção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp – Botucatu – SP, Denise A. Fioravante Garcia, Maria Regina T. Forlin, Maria A. Manuel e José Roberto de Lalla Júnior, pelos préstimos e atenção no esclarecimento de todas as dúvidas;

Aos senhores Marcos Donizeti Gouvêa, Marco Antonio Simão da Silva, funcionários do Serviço de Clínica de Grandes Animais da FMVZ - Unesp – Botucatu – SP, por me acompanharem nos dias de coleta, contribuindo para que o experimento fosse realizado com o máximo de aproveitamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
CCS	Contagem de Células Somáticas
CECS	Contagem Eletrônica de Células Somáticas
Cel.	Célula
CMT	Califórnia Mastitis Test
CS	Célula somática
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IBR	Rinotraqueite infecciosa bovina
IM	Intramuscular
L	Litro
mg	Miligramas
mL	Mililitros
Nº	Número
NRC	National Research Council
NUPEMAS	Núcleo de Pesquisa em Mastite
ppm	Parte por milhão
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	Ácido ribonucléico
Se	Selênio
UI	Unidade Internacional
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Vit. E	Vitamina E
WMT	Wisconsin Mastitis Test
Zn	Zinco

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias aritméticas e desvio padrão da CCS dos tratamentos do grupo A, em cada um dos momentos ($p \leq 0,05$)	36
Tabela 2. Médias aritméticas e desvio padrão da CCS dos tratamentos do grupo B, em cada um dos momentos ($p \leq 0,05$).....	36
Tabela 3. Comparação entre as médias e desvio padrão da CCS do momento zero (M0) dos grupos A e B.....	36

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Zinco	16
2.2 Vitamina E.....	20
2.3 Células somáticas.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Grupos.....	28
4.3 Colheita de material.....	31
4.4 Contagem eletrônica de células somáticas.....	32
4.5 Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Grupo A	35
5.2 Grupo B	35
5.3 Grupo A Grupo B	35
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	40
8. BIBLIOGRAFIA	41
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	49
10. ANEXOS.....	63

GARCIA, A.C.F.Z. **Utilização da suplementação de zinco orgânico e vitamina e na contagem de células somáticas do leite bovino.** Botucatu, 2007. 80p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A contagem de células somáticas no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, diretamente, como indicadora da produção higiênica do leite. Por este motivo, este trabalho tem como objetivo avaliar se há redução na contagem de células somáticas no leite de vacas leiteiras suplementadas com zinco e da vitamina E. Selecionou-se 76 vacas provenientes de duas fazendas de leite tipo “C” do município de Botucatu-SP. Os animais foram divididos em três subgrupos (A1 e B1 - suplementados com 5 gramas de Zn, A2 e B2 - suplementadas com 9000UI de vit. E e A3 e B3 – não suplementadas), amostras de leite dos quatro tetos foram coletadas quinzenalmente em três momentos (M0-antes suplementação, M1-durante suplementação, e M2- após término suplementação), enviadas ao NUPEMAS da FMVZ Unesp-Botucatu, para determinação da contagem eletrônica de células somáticas (CECS). Os animais suplementados com Zinco orgânico apresentaram redução na contagem de células somáticas, enquanto que os suplementados com vitamina E não apresentaram tal redução.

Palavras chave: zinco, vitamina E, contagem de células somáticas, leite, vaca.

GARCIA, A.C.F.Z. **Supplementation of the organic zinc and of the vitamin E for reducing the somatic cells counting in dairy cow**. Botucatu, 2007. 80p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The somatic cells counting in dairy cow is used as an indicative factor for the quality of milk, for controlling mastitis and, indirectly, as an indicator of a hygienic milk production. For that reason, this study aims at analyzing if there was a reduction in somatic cells counting in the dairy cow, whose animals were supplemented with organic Zinc and vitamin E. An amount of 76 cows were study. They derived from two dairy farms in the Botucatu town, São Paulo, which produce type “C” milk. The animals were divided into 2 (two) groups and each group were divided into 3 (three) treatments groups (A1 and B1 - supplemented with 5 grams of Zn, A2 and B2 - supplemented with 9000UI of vit. E, and A3 and B3 – non supplemented). Samples of milk were biweekly collected, in three different periods (M0 - before supplementing, M1 -during supplementing and M2 - after supplementing). Such samples were sent to NUPEMAS of FMVZ, at UNESP - Botucatu, in order to determine the somatic cells counting (SSC). The animals which were supplemented with organic zinc presented reduction in somatic cells counting, and the animals supplemented with vitamin E not.

Key words: zinc, vitamin E, somatic cells counting, milk, cow.

1 .INTRODUÇÃO

O sistema agro-industrial do leite, devido a sua enorme importância social, é um dos mais importantes do país. A atividade é praticada em todo o território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional. Três importantes fatores marcaram o setor leiteiro nacional, principalmente na última década: o aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo dos preços recebidos pelos produtores (VILELA *et al*, 2002).

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporciona nutrientes e proteção imunológica para o neonato. Além de suas propriedades nutricionais, o leite oferece elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura, como o ácido linoleico conjugado, esfingomielina, ácido butírico, β caroteno, vitaminas A e D (MÜLLER, 2002).

De modo geral o controle da qualidade do leite nas últimas décadas tem se restringido à prevenção de adulterações do produto “in natura” baseada na determinação da acidez, índice crioscópico, densidade, percentual de gordura e extrato seco desengordurado. A contagem global de microrganismos aeróbios mesófilos (indicadores de qualidade microbiológica do produto) tem sido utilizada somente para leite cru do tipo A e B (OLIVEIRA *et al*, 1999).

A qualidade do leite “in natura” é influenciada por diversas variáveis, entre as quais se destacam fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite. Uma das causas que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite, é a mastite, acompanhada por um aumento na contagem de células somáticas (CCS) no leite (MÜLLER, 2002).

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada na sua grande maioria por bactérias, é uma doença que causa grande prejuízo à pecuária leiteira. No entanto a maior preocupação do produtor de leite é a mastite subclínica, que não pode ser diagnosticada pela observação visual do úbere do

animal e do leite, e sim pela presença de elevadas contagens de células somáticas no leite (LANGONI, 2000).

A contagem de células somáticas no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, indiretamente, como indicadora da produção higiênica do leite (SMITH (1996), *apud* SILVEIRA *et al*, 2005; MÜLLER, 2002; WINDIG *et al*, 2005).

Muito se tem discutido sobre os padrões de CCS e sua importância para assegurar a higiene e qualidade do leite. Segundo Godkin (2000) *apud* Silveira *et al* (2005), ainda não existe regulamentação para a CCS do leite no comércio internacional, entretanto alguns países adotaram limites máximos de CCS como parte do padrão nacional de regulamentação. No Canadá e nos Estados Unidos os padrões são de, respectivamente, 500.000 cel/mL de leite e 750.000 cel/mL de leite e na União Européia, é de 400.000 cel/mL de leite . No Brasil, em razão das grandes diferenças regionais, para implantação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite foram estabelecidos, inicialmente, padrões acima dos limites aceitáveis pelos países acima citados (SILVEIRA *et al*, 2005).

Altas contagens de células somáticas indicam presença de mastite, vacas sadias apresentam contagem de células somáticas que podem variar de 50.000 a 200.000 células/mL de leite (LANGONI, 2000).

Vários testes são utilizados para se realizar a contagem de células somáticas no leite, estes são divididos em testes indiretos, tais como o WMT (Wisconsin Mastitis Test), CMT (California Mastitis Test), e testes diretos como a CECS (Contagem eletrônica de células somáticas), e a contagem microscópica direta em lâmina (LANGONI, 2000; SERRANO *et al*, 2003; PAULA *et al*, 2004; SILVEIRA *et al*, 2005; WINDIG *et al*, 2005).

O Zinco é um nutriente que está ligado diretamente ao sistema imunológico do organismo, sua função está relacionada com o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos, produção de energia, síntese protéica, metabolismo de carboidratos, componentes da insulina, estabilização das membranas contra endotoxinas bacterianas e produção de enzimas antioxidantes (BEISEL,1982; PRASAD,1983; CLARK *et al*,1994; NRC, 2001; GRIFFITHS *et al*, 2007).

A vitamina E é um antioxidante que evita lesão oxidativa de lipídios sensíveis da membrana e diminui a formação de hidroperóxido. Tem um papel central na proteção de membranas celulares contra a lipoperoxidação, especialmente membranas ricas em lipídios insaturados, como as mitocôndrias do retículo endoplasmático e as plasmáticas. Ela estimula macrófagos e linfócitos, melhorando a resposta imune (PAES *et al*, 2003; PASCHOAL *et al*, 2006).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ZINCO

O zinco é essencial para o desenvolvimento, crescimento e diferenciação de tecidos de todas as espécies. Sua proporção no organismo animal varia de acordo com a espécie considerada. O NRC (National Research Council) recomenda 40 ppm/dia de zinco para bovinos (ANDRIGUETTO, 1990; LEDIC, 2002; PARDO *et al*, 2004).

Este micromineral é encontrado principalmente no núcleo celular, sangue, pele, gônadas e células β das Ilhotas de Langerhans, que são especialmente ricas neste elemento; aparece em quantidades relativamente altas no leite de vaca (3,0 a 5,0 mg/L) (ABRAMS, 1965; MAYNARD, 1966; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990; PARDO *et al*, 2004).

O zinco é componente de algumas metaloenzimas, tais como superóxido-desmutase, anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidase, fosfatase alcalina, DNA e RNA polimerases, com efeitos nos metabolismos dos carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (AZEVEDO, 2006). Atua como constituinte da carboxipeptidase pancreática, deoxitimidinaquinase, estando, portanto, envolvido com a síntese protéica, calcificação dos ossos, formação da casca do ovo (ABRAMS, 1965; CUNNINGHAM, 1982; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990; BALTACI *et al*, 2004).

A DNA polimerase e a transcriptase reversa também são enzimas zinco dependentes, desta forma, a proliferação epitelial e fibroblástica necessitam dele para sua ação (ABRAMS, 1965; CUNNINGHAM, 1982; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990).

Sem níveis adequados deste elemento, não ocorre multiplicação das células epiteliais e dos fibroblastos, não ocorrendo a epitelização e a síntese de colágeno, levando assim, à má cicatrização. O excesso de zinco pode levar à inibição dos macrófagos e diminuir a fagocitose, e também interferir na ligação cruzada do colágeno (PRASAD, 1983; PROBST, 1999).

O zinco diminui a invasão de patógenos na mama por sua atuação sobre a produção de queratina de revestimento do canal do teto. Essa queratina atrai

as bactérias e previne a penetração delas para dentro da mama (CRAVEN & WILLIAMS, 1985; NICKERSON, 1990). Como aproximadamente 40% da queratina do canal do teto de vacas da raça holandesa é removida no processo de ordenha, ela requer contínua regeneração (CAPUCO *et al*, 1992).

A taxa de zinco no sangue é de 75% nas hemáceas, 22% no plasma e 3% nos leucócitos. Também é encontrado em altas concentrações no leite, queratina, próstata, pele, fígado, pêlos, pâncreas e ossos (ABRAMS, 1965; MAYNARD, 1966; BEISEL, 1982; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990).

A absorção do zinco ocorre principalmente no intestino delgado, sendo o duodeno o local mais ativo dessa absorção; em bovinos esta absorção também ocorre no abomaso (MILLER, 1970; KINCAID, 1979; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990) e rúmem, e a excreção ocorre principalmente pelas fezes embora ocorra em menor parte pela urina (ABRAMS, 1965; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990). De acordo com MILLER (1970), a absorção do zinco aumenta quando há menor oferta alimentar deste elemento.

O excesso de cálcio na dieta tem um efeito antagônico ao zinco, ou seja, o aumento do cálcio diminui a absorção de zinco (MAYNARD, 1966; BATH, 1978; KINCAID, 1979; CLARK *et al*, 1994; PARDO *et al*, 2004).

A deficiência deste microelemento nos animais domésticos pode levar à diminuição na eficiência alimentar, crescimento e desenvolvimento testicular retardado, letargia, aumento da susceptibilidade a infecções secundárias, crescimento rápido de bactérias na mucosa oral, inflamação cutânea e de mucosa oral e nasal, diminuição da produção de leite e da fertilidade, andar rígido, inchaço dos jarretes e joelhos, anormalidades ósseas, mastite, aumento das células somáticas no leite (MILLER, 1970; HIDIROGLOU, 1980; ANDRIGUETTO, 1990; WHITAKER *et al*, 1997).

O zinco é um nutriente que está ligado diretamente ao sistema imunológico do organismo, sua função está relacionada com o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos, produção de energia, síntese protéica, metabolismo de carboidratos, componentes da insulina, estabilização das membranas contra endotoxinas bacterianas e produção de enzimas antioxidantes (BEISEL, 1982; PRASAD, 1983; CLARK *et al*, 1994; GRIFFITHS *et al*, 2007).

Clark *et al* (1994), verificaram redução na maturação de espermatozóides, diminuição na circulação de testosterona, em alguns casos, aborto, mumificação fetal, baixo peso ao nascer e alterações na contractilidade do miométrio, em bovinos de corte.

A literatura relata que a involução progressiva do timo associada à deficiência de zinco, tanto em animais como em humanos (GOOD *et al*, 1980; BEISEL, 1982; CUNNINGHAM, 1982; CLARK *et al*, 1994). Good *et al* (1980) e Cunningham (1982) observaram que a deficiência de zinco está relacionada a esta involução, e tem influência sobre os linfócitos T e imunidade celular. Os animais por eles estudados apresentaram dermatite, letargia, hiperqueratose, paraqueratose e alopecia. Descreveram ainda, que bovinos da raça Holandesa apresentaram mutação genética letal, determinada pela má absorção de zinco, o timo destes animais não era desenvolvido e, portanto apresentavam alterações na função dos linfócitos T. O timo dos bezerros acometidos pesou em média 9,5 gramas e o de bezerros sadios cerca de 372 gramas. Os bezerros morreram por infecção, devido à depressão imunológica. Good *et al* (1980) observaram a diminuição dos hormônios tímicos com a restrição progressiva de zinco.

A deficiência de microelementos promove a alteração de vários componentes do sistema imune, como a diminuição da função dos neutrófilos em ruminantes, diminuição da resposta mediada por anticorpos e o interrompimento do crescimento de tecidos T dependentes (BEISEL, 1982; CLARK *et al*, 1994).

Animais com status subclínico de zinco podem continuar a se reproduzir e/ ou crescer, mas a taxa é reduzida, já que têm diminuição da eficiência alimentar e depressão do sistema imune (CLARK *et al*, 1994).

Vários agentes estressantes como as doenças infecciosas resultam na redistribuição do zinco plasmático para o fígado. A deficiência de zinco é facilmente reproduzida, pois não existe nenhum órgão específico para estocá-lo (BEISEL, 1982). Este microelemento pode ser encontrado além do fígado, no baço, pâncreas, rins, medula óssea e núcleo celular (MILLER, 1970; GOOD *et al*, 1980; BEISEL, 1982; CUNNINGHAM, 1982; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990; PARDO *et al*, 2004).

Em casos graves de rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), o aumento de zinco na dieta dos animais infectados, pode melhorar sua recuperação (DEPELCHIN *et al*, 1985).

A literatura demonstra que ocorre um aumento no nível de zinco plasmático após sua suplementação oral. Animais com deficiência de zinco, depois de suplementados com este micromineral, seja sob a forma de carbonatos, proteinatos, sulfatos, óxidos ou cloretos, apresentaram melhora satisfatória dos sinais clínicos, com total recuperação, sem afetar a produção de leite (MILLER, 1970; KINCAID, 1979; GOOD *et al*, 1980; HIDIROGLOU, 1980; BEISEL, 1982; CUNNINGHAM, 1982; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990; CLARK *et al*, 1994; GRIFFITHS *et al*, 2007).

Kessler *et al* (2003), compararam o uso do zinco orgânico com o zinco inorgânico na alimentação de touros bovinos, em relação à melhora na qualidade da carne, carcaça e casco, e observaram que houve melhora apenas no casco dos animais alimentados com zinco orgânico e, os alimentados com zinco inorgânico, não apresentaram melhora significativa.

Cunha Filho (2006) observou que bovinos suplementados com levedura viva como fonte de zinco mantiveram baixa a contagem de células somáticas e menor número de lesões podais do que os animais do grupo não suplementado. Resultado semelhante, quanto a lesões podais, também foram observados por Pardo *et al* (2004).

Griffiths *et al* (2007), verificaram que bovinos alimentados com zinco apresentavam redução na CCS, aumento na produção de leite e melhora na integridade do casco.

2.2 VITAMINA E

Em 1920, resultante do estímulo à experimentação com dietas purificadas foi que se seguiu à descoberta da primeira vitamina. Em 1922, Evans e Bishop observaram que a ausência de um fator alimentar lipossolúvel, presente nas folhas verdes e germe de trigo, na dieta de ratas gestantes resultava na reabsorção e morte fetal, apesar da ovulação e concepção estarem ocorrendo normalmente. Pesquisas em torno da causa dessa falha resultaram na descoberta, no início de 1930, por Evans, Mattil, Sure e suas respectivas equipes, nos Estados Unidos, que existe um fator dietético específico essencial para a reprodução no rato. Sure chamou-a de **vitamina E**, que como se sabe consiste basicamente, de tocoferóis. Em 1936, foram obtidas as extrações das primeiras preparações de vitamina E, a partir de azeite de germe de trigo, por Evans e sua equipe, mas a síntese da vitamina ocorreu apenas em 1938, por Karrer (MAYNARD, 1966).

Em 1970, Bland e seu assistente, examinaram a influência da vitamina E na oxidação da membrana celular de eritrócitos sob estresse de ação fotodinâmica, após a incubação de eritrócitos humanos e sua exposição à luz e ao oxigênio, com diferentes concentrações de vitamina E. Descobriram que poderiam estender a capacidade efetiva dos eritrócitos de resistir à exposição fotodinâmica, quando aumentavam a concentração de vitamina E. Em seguida realizaram um estudo *in vivo*, no qual humanos consumiam quantidades crescentes de vitamina E e seus eritrócitos foram subsequentemente expostos a condições fotodinâmicas *in vitro*. Observaram que as concentrações aumentaram cerca de 100% nos voluntários estudados, e que o conteúdo de vitamina E da membrana eritrocitária aumentou 56% após a suplementação. Observaram ainda, que a ingesta suplementar de 400UI de vitamina E, poderia estender o período de vida funcionante dos eritrócitos expostos à luz e oxigênio em três ou quatro vezes (BLAND, 1998).

As vitaminas E, ou tocoferóis, são um grupo de vitaminas lipossolúveis essenciais, que protegem o organismo das moléculas tóxicas (ABRAMS, 1965; PASCHOAL *et al*, 2006). O teor de gordura na dieta é composto por ácidos graxos saturados e insaturados. Os insaturados têm a tendência de sofrerem oxidação, formando peróxidos, processo este conhecido como rancificação. Os

peróxidos são tóxicos e causam hemólise intensa, observando-se musculatura clara, retenção de placenta, degeneração dos músculos cardíacos e respiratórios, pneumonia secundária e diarreias (RADOSTITS *et al*, 2001).

Esta vitamina é um antioxidante que protege as células fagocíticas e os tecidos, do ataque de radicais livres, melhorando a função dessas células e consequentemente, aumentando as defesas do organismo e minimizando os danos comprometedores sobre as células de defesa da glândula mamária (BEISEL, 1982; POLITIS *et al*, 1995; NOCKELS, 1996; NRC, 2001; PAES *et al*, 2003; GUPTA *et al*, 2005). A forma mais ativa é o α -tocoferol, que também é a forma mais comumente encontrada (ABRAMS, 1965; NRC, 2001; SEDDON, 2005), embora se conheçam ainda, outras três formas de tocoferol também ativas, que ocorrem naturalmente, β (beta), γ (gama), δ (delta), (MAYNARD, 1966). A vitamina E pode inibir este processo, e parece ser essencial para todos os tipos celulares, tendo sido associada com uma série de funções nos sistemas reprodutivo, nervoso, circulatório, músculo esquelético e hematopoiético (MILLER *et al*, 1993).

O α -tocoferol é abundante em cereais integrais e seus subprodutos, também é encontrado em forrageiras de boa qualidade e em outros materiais folhosos, inclusive feno de boa qualidade (REBHUN, 2000; SEDDON, 2005). A alfafa é particularmente rica. Os subprodutos animais fornecem apenas quantidades limitadas, sendo que o leite e seus derivados são fontes pobres desta vitamina. Ovos, em particular a gema, podem possuir quantidade significativa de vitamina E, dependendo, contudo, da alimentação da galinha (MAYNARD, 1966; PITA *et al*, 2006). Óleos de germes de trigo são as fontes naturais mais concentradas. Vários outros óleos, como o de soja, amendoim, e particularmente o de caroço de algodão, são também ricos em tocoferóis, embora a maioria das farinhas (tortas e farelos) do mercado sejam destituídas destes óleos, por causa da sua extração por solventes (MAYNARD, 1966).

As forrageiras frescas possuem cerca de 80 a 200 UI de vitamina E / kg de matéria seca. As concentrações de α -tocoferol nas forrageiras diminuem rapidamente após o corte e exposição exacerbada ao sol. A silagem e o feno possuem de 20 a 80% menos α -tocoferol do que a forragem fresca. O feno e a palha de baixa qualidade têm pouca vitamina E, e o pasto rico em lignina tem menor concentração dela. Em geral a concentração de vitamina E nos

concentrados é baixa; a soja e o caroço de algodão, frescos, são exceções, mas quando são tratados pelo calor, o α -tocoferol é todo destruído. A concentração do α -tocoferol é inversamente proporcional ao tempo de estocagem (NRC, 2001).

Nutrientes antioxidantes como a vitamina E, β - caroteno e microelementos como o selênio, cobre, zinco e manganês são muito importantes na proteção dos tecidos animais contra a destruição oxidativa. Esta proteção também melhora os resultados na resposta imune, diminuindo as mastites nas vacas leiteiras e a incidência de doenças infecciosas em animais estressados (POLITIS *et al*, 1995; NOCKELS, 1996; NCR, 2001; RADOSTITS *et al*, 2001; RAMÍREZ-BRIBIESCA *et al*, 2005; BOURNE *et al*, 2007).

No caso de se formarem peróxidos, eles são destruídos pela enzima glutathionaperoxidase, que contém selênio em sua molécula (RADOSTITS *et al*, 2001).

O primeiro estudo sobre o efeito do Selênio (Se) e da vitamina E (vit. E) na incidência de mastite clínica foi realizado por Smith em 1984. Os autores verificaram diminuição de 37% na incidência de mastite clínica em vacas que receberam suplementação de 740 UI de vit. E por dia, durante o período seco (PASCHOAL *et al*, 2006).

Hidiroglou *et al* (1988), administrando 4500UI de acetato de DL- α -tocoferol pela via intramuscular, observou concentração máxima no soro de 11,09 μ g/mL decorridas 24 horas da aplicação, com declínio gradativo dos valores, chegando aos níveis próximos do obtido antes da aplicação (1,61 μ g/mL) até 27 dias pós-tratamento.

Nockels, em 1996, observou que vacas que receberam 1000UI/animal de vitamina E apresentaram redução de 37% no índice de mastite, 21 dias antes do parto e em 12% para as que receberam 0,1 mg selenito de sódio /kg, quando comparadas com as do grupo controle. Os animais dos grupos suplementados tiveram redução significativa na duração dos sinais clínicos, e além disso, as suplementadas com injeções de vit. E e Se, tiveram menor duração dos sinais clínicos quando comparadas às que receberam injeções de Se ou vit. E isoladas. Observou também, que a suplementação de selênio e vitamina E, aumentou os níveis sanguíneos de vitamina E, selênio e glutathiona

peroxidase no parto, e diminuiu significativamente a contagem de células somáticas (CCS) em 14 dias de lactação.

Morgante *et al* (1995, 1999) citados por Pulina *et al* (2006) verificaram que com a administração de vit. E e Se na ração de ovelhas de leite houve manutenção das respostas imunes nas células da glândula mamária, reduzindo assim, a incidência de infecção e consequentemente aumento na CCS do leite.

Reddy *et al* (1986) verificaram que em bezerros suplementados com 1400 UI de DL α -tocoferol, uma vez por semana, por via IM, houve estimulação de linfócitos e eles foram capazes de reduzir títulos de replicação viral. A administração de 2000 UI de DL- α -tocoferol em novilhas aumentou os níveis de α -tocoferol no sangue e também promoveu estimulação de linfócitos.

Paes *et al* (2003), notaram que a administração de 2000UI de vitamina E por via intramuscular em cabras, reduziu a incidência de metrite, retenção de placenta e mastites e contagem de células somáticas no leite.

Paschoal *et al* (2006) avaliaram o efeito da suplementação de Se e vit. E sobre a CCS no leite de vacas da raça Holandesa, utilizando 1000 UI de vit. E e 2,5 mg de Se por via oral, misturados à ração isoladamente ou em associação e observaram que não há efeito desta suplementação sobre a CCS, pelo menos nesta dosagem.

A adição da vitamina E melhora a resposta imune em diferentes espécies animais atuando tanto na melhora da resposta humoral quanto na celular (BEISEL, 1982; REDDY *et al*, 1986; TIZZARD, 1998).

2.3 CÉLULAS SOMÁTICAS

Células somáticas são os neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos e células de descamação, presentes nos líquidos corpóreos. Este termo foi adotado em 1910, por haver muita confusão quanto à terminologia a ser empregada (SCHALM *et al*, 1971). As células somáticas são representadas pelos leucócitos (glóbulos brancos do sangue) e células epiteliais provenientes da esfoliação dos ácinos galactóforos do úbere, cisterna mamária e cisterna do teto e são eliminadas no leite durante a lactação (AMARAL *et al*, 2005).

Essas células apresentam duas funções:

1-) combater os microrganismos nas infecções intramamárias;

2-) auxiliar na reparação dos tecidos secretores do leite, lesados pelo processo infeccioso e, conseqüentemente, inflamados (LANGONI, 2000).

A CCS no rebanho e no tanque de expansão deve ser vista como ferramenta extremamente valiosa que apresentam entre outras finalidades: monitoramento da prevalência de mastite subclínica no rebanho, da qualidade do leite para a indústria, e da indicação das condições higiênicas de sua produção nas propriedades; estimativas das perdas da produção de leite; orientação do produtor na tomada de decisões para prevenir a transmissão da mastite durante a lactação; identificação de vacas mastíticas para tratamento, secagem e descartes (MÜLLER, 2002; PAULA *et al*, 2004).

Altas contagens de células somáticas afetam a composição do leite e o tempo de prateleira dos derivados lácteos, causando grandes prejuízos para a indústria de laticínios (PAULA *et al*, 2004).

De acordo com a Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 do RIISPOA, as contagens de células somáticas do leite devem ser feitas pela média geométrica em um período de 03 (três) meses, com pelo menos 01 (uma) análise mensal, em Unidade Operacional da Rede Brasileira de Laboratórios para Controle da Qualidade do Leite, independentemente das análises realizadas na frequência estipulada pelo Programa de Controle de Qualidade interno da Granja Leiteira (BRASIL, 2002).

O valor da Contagem de Células Somáticas (CCS) estipulado pelo RIISPOA, para leites tipo A e B é 600.000 CS/mL de leite no máximo e, para o leite tipo C, não há necessidade desta contagem. Quanto a um processo infeccioso, estima-se que uma vaca saudável apresente 300.000 CS/mL de leite, ou seja, 65 – 80% de seu epitélio íntegro. Valores maiores indicam um processo infeccioso (BRASIL, 2002).

O zinco está envolvido na queratinização dos tecidos epiteliais. Entre estes tecidos está o canal do teto, o que é porta de entrada para microorganismos. Existe envolvimento ainda com o sistema imunológico e, sua deficiência pode, portanto, ser fator predisponente para a mastite e aumento de células somáticas no leite (RADOSTITIS *et al*, 2001).

A vit. E é um antioxidante que protege as células fagocíticas e os tecidos, do ataque de radicais livres, melhorando a função dessas células e consequentemente, aumentando as defesas do organismo e minimizando os danos comprometedores sobre as células de defesa da glândula mamária (BEISEL, 1982; POLITIS *et al*, 1995; NOCKELS, 1996; NRC, 2001; PAES *et al*, 2003; GUPTA *et al*, 2005).

Whitaker *et al* (1997), verificaram que vacas leiteiras alimentadas com quelato ou proteinato de zinco não apresentaram diferença estatística na redução da contagem de células somáticas do leite.

Harmon (1998) *apud* Paschoal *et al* (2006), reforça a importância da padronização da CCS para avaliação da qualidade do leite, ressaltando que já é utilizada em países desenvolvidos, por refletir a incidência de mastites subclínicas.

Prada e Silva *et al* (2000), verificaram o efeito do nível de células somáticas sobre as concentrações de lactose e sólidos totais do leite, e observaram que o aumento da CCS está relacionado com a redução da concentração da lactose, pois na infecção da glândula mamária, ocorre destruição do tecido secretor e, portanto há a redução na habilidade de síntese da glândula mamária e consequentemente redução de lactose. Este fato não possui relação com a concentração de sólidos totais, que não variou significativamente.

Búfalas com elevada CCS apresentam redução na produção de leite, alterações dos teores de seus constituintes e do tempo de coagulação do leite

no processo de fabricação de queijos, comprometendo a qualidade, processamento e rendimento industrial (AMARAL *et al*, 2005).

Green *et al* (2006) verificaram que animais com alta produção de leite, apresentam CCS baixa e que animais com baixa produção de leite apresentam CCS alta, concluíram que isto se dá por causa da "diluição" da célula somática no leite e ao efeito compensatório que pode ocorrer no caso de um dos quartos estar com infecção.

Pulina *et al* (2006), observaram que o aumento da CCS no leite de ovelhas, reduz a caseína do leite e consequentemente a produção de queijo produzido.

Leitner *et al* (2007) avaliaram o nível de perdas na produção de leite e consequentemente de queijo de ovelhas e cabras, com infecção intramamária em relação a CCS. Mostraram que houve interferência na qualidade dos queijos produzidos, o que indica que a contagem de células somáticas pode ser considerada como uma excelente ferramenta no diagnóstico de infecção intramamária subclínica, também para ovelhas e cabras.

A contagem de células somáticas pode ser influenciada pelo número de lactações, fase da lactação, raça, entre outros (LANGONI, 2000; PAULA *et al*, 2004; SILVEIRA *et al*, 2005)

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se há redução contagem de células somáticas do leite de vacas bovinas suplementadas com zinco orgânico e com vitamina E.

3.2 Objetivo Específico

Avaliar o efeito da suplementação do zinco e da vitamina E, quanto:

- Contagem de células somáticas;
- Higiene.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 40 vacas da raça Holandesa, variedade preto e branco, e 36 vacas da raça Girolanda, provenientes de duas fazendas produtoras de leite do Município de Botucatu, todas com idade variando entre 5-8 anos e com 20-35 dias de lactação.

4.2 GRUPOS

Os animais foram divididos em dois grupos conforme sua procedência, da seguinte maneira:

GRUPO A: 40 vacas leiteiras da raça Holandesa, variedade Preta e Branca (Figura 1) ; pertencentes a uma fazenda produtora de leite tipo “C”, com duas ordenhas diárias e, esta mecânica (Figura 3), e sala de ordenha tipo escama de peixe para dez animais, higienizada após o término da ordenha com hipoclorito de sódio à 5%, água sob pressão e detergente neutro. Para a ordenha a sala era preenchida com cinco vacas de cada lado. Antes da retirada do leite, as teteiras eram mergulhadas em balde contendo solução de hipoclorito de sódio e o excesso retirado por movimentos repetidos para cima e para baixo, neste momento era realizado o “pré-deeping” nos tetos dos animais com a mesma solução e teste CMT. Após a ordenha eram retiradas as teteiras e feito o “pós-deeping” com tintura de iodo a 0,2%. Todos os animais ao saírem da sala de ordenha eram encaminhados ao barracão de arração com cocho em canzil onde recebiam ração.

GRUPO B: 36 vacas da raça Girolanda (Figura 2), provenientes de uma fazenda produtora de leite tipo “C”, com ordenha manual (Figura 4) e uma ordenha diária. Nesta propriedade a “mangueira” era utilizada como sala de ordenha sem higienização prévia. Os animais foram amarrados em mourões de madeira com cocho individual, onde era colocada polpa cítrica para que os animais se mantivessem calmos durante a retirada de leite. No momento da ordenha os bezerros das vacas a serem ordenhadas eram colocados para

apojá-las, feito isto, um “paninho” era utilizado para se retirar o excesso de saliva deixado pelo bezerro, ou lama quando em época de chuva, lembrando que este era usado para todas as vacas. No final da ordenha os animais eram soltos num pátio de terra, onde aguardavam para serem conduzidos ao pasto.



Fig. 1 Lote grupo A



Fig. 2 Lote grupo B



Fig. 3 Ordenha Mecânica (grupo A)



Fig. 4 Ordenha manual (grupo B)

Estes dois grupos foram subdivididos em subgrupos para tratamentos com Zinco orgânico, vitamina E e controle, como se segue abaixo:

SUBGRUPO 1A: constituído de 16 vacas que foram suplementadas com 5,0 gramas de um produto comercial correspondente a 16% de proteinato de zinco, diariamente, por via oral durante 3 (três) meses, representando uma suplementação de 750mg/vaca/dia (CUNHA FILHO, 2006).

SUBGRUPO 2A: composto de 12 vacas que foram suplementadas quinzenalmente com 10 mL de Vitamina E¹ por via intramuscular, dose

¹ Monovin E® - Bravet

equivalente a 9000 UI, com uma seringa de 10 mL e agulha hipodérmica 40 X 12, descartáveis, durante 3 (três) meses.

SUBGRUPO 3A: grupo controle, constituído de 12 vacas sem suplementação de zinco orgânico e de vitamina E¹.

SUBGRUPO 1B: constituído de 12 vacas que foram suplementadas com 5,0 gramas de um produto comercial correspondente a 16% de proteinato de zinco, diariamente, por via oral durante 3 (três) meses, representando uma suplementação de 750mg/vaca/dia (CUNHA FILHO, 2006).

SUBGRUPO 2B: composto de 12 vacas que foram suplementadas quinzenalmente com 10 mL de Vitamina E¹ por via intramuscular, dose equivalente a 9000 UI, com uma seringa de 10 mL e agulha hipodérmica 40 X 12, descartáveis, durante 3 (três) meses.

SUBGRUPO 3B: grupo controle, constituído de 12 vacas sem suplementação de zinco orgânico e de vitamina E¹.

4.3 COLHEITA DO MATERIAL

O experimento foi realizado por 7 meses, no período de Abril a Outubro de 2007. Para a colheita de material foram determinados três momentos:

MOMENTO ZERO (M0): colheita quinzenal das amostras de leite para contagem eletrônica de células somáticas de todos os animais, dos três grupos, durante os dois primeiros meses, antes da administração dos suplementos;

MOMENTO UM (M1): colheita quinzenal das amostras de leite para contagem eletrônica de células somáticas de todos os animais, dos três grupos, durante os três meses da administração dos suplementos;

MOMENTO DOIS (M2): colheita quinzenal das amostras de leite para contagem eletrônica de células somáticas de todos os animais, dos três grupos, durante os dois meses posteriores ao término da administração dos suplementos;

Cada amostra corresponde a 50mL, oriundas da mistura do leite dos quatro tetos de cada vaca, desprezando-se os três primeiros jatos deste, que depois de colhidas foram acondicionadas em tubos plásticos próprios para contagem eletrônica de células somáticas, contendo 2 pastilhas de conservante Bronopol² e homogeneizadas. Os tubos foram identificados com o número do animal. O material foi então enviado ao Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS), da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Botucatu no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, no Distrito de Rubião Júnior, para realização da CECS em aparelho Somacount 300®³.

O projeto foi examinado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMVZ – UNESP- Botucatu.

² Bronopol (2-bromo 2- nitro propano – 1,3-diol)

³ Bentley Instruments Inc.

4.4 CONTAGEM ELETRÔNICA DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A contagem foi realizada com o auxílio do aparelho Somacount 300® (Figura 5).

O Somacount, que pode ler 300 amostras por hora, por exemplo, é composto por 5 (cinco) estruturas:

- 1- Conjunto de fluidos como o corante brometo de etidium e o de carreamento, que é o detergente RBS;
- 2- Computador (software);
- 3- Canhão de laser;
- 4- Leitor, denominado “Flow cell”;
- 5- Tubo foto multiplicador, que faz a conversão de impulsos luminosos para impulsos elétricos.



Fig. 5 Somacount 300®

As amostras a serem examinadas foram mantidas em temperatura ambiente e examinadas, no máximo, em 5 a 7 dias após sua obtenção acondicionando-se no frasco coletor e homogeneizando-se com o conservante.

Antes da amostra ser colocada no aparelho, foi aquecida em banho-maria por 15 (quinze) minutos a 40°C para que não houvesse choque térmico. No aparelho, uma alíquota da amostra é aspirada e aquecida em uma serpentina a 68°C e então levada a uma seringa contendo corante tampão (brometo de etidium) que cora o núcleo das células. Em seguida, 50µL da amostra são carregadas até o “flow cell”, por um líquido carreador (RBS), onde ocorre a incidência de raio laser sobre ela, produzindo uma pequena explosão luminosa, de curta refração, que atravessa uma série de filtros ópticos e lentes, sendo

focada em um comprimento de luz apropriado. Esses pulsos de luz são convertidos em pulsos elétricos, amplificados, eletronicamente filtrados e ordenados por tamanho para que se especifiquem as células somáticas. O computador conta os pulsos elétricos, traduzindo a contagem de leucócitos (BENTLEY, 2000).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a contagem de células somáticas foi utilizada a análise não paramétrica com aplicação do teste de Friedman para a comparação dos momentos, com cada grupo, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação dos grupos com cada momento (ZAR, 1996).

5. RESULTADOS

5.1 Grupo A

Com os resultados obtidos na análise estatística, observou-se que os animais suplementados com 750 mg de Zn, apresentaram valores médios de células somáticas no M1, menores que nos M0 e M2, quando esses valores começam a aumentar (Tabela 1).

Os animais tratados com 9000 UI de vit. E apresentaram valores baixos de células somáticas no M0, em M1 a média aritmética desses valores foi muito alta, voltando a diminuir em M2, como durante o tratamento não houve redução, pode-se dizer que para este grupo, a vitamina E não teve efeito sobre a redução de células somáticas (Tabela1).

5.2 Grupo B

Neste grupo observa-se que vacas que receberam tratamento com zinco, quando comparadas com seu M0 tiveram redução em M1 e esta diminuição permanece em M2, demonstrando que o Zn reduz a contagem de células somáticas e não apresenta efeito residual (Tabela 2).

O grupo dos animais suplementados com vit. E apresentaram valores menores de células somáticas no M0 do que em M1 e M2. Assim como para os animais do grupo A, a suplementação não contribuiu para a redução das células somáticas (Tabela2).

5.3 Grupo A x Grupo B

Para se comparar o efeito higiene entre as fazendas, calculou-se a média e desvio padrão da CCS de todos os animais dos dois grupos no M0, onde pode-se notar que o grupo B apresentou valores menores que o grupo A (tabela3).

Tabela 1: Médias aritméticas e desvio padrão da CCS dos tratamentos do grupo A, em cada um dos momentos ($p \leq 0,05$):

Grupos		<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>Interpretação estatística</i>
Zinco (1A)	média	970,32	530,15	604,03	M0 < M1 < M2
	<i>s</i>	884,17	430,99	624,82	
Vit. E (2A)	média	491,01	1056	818,25	M0 > (M1>M2)
	<i>s</i>	417,08	758,24	908,05	
Controle (3A)	média	253,97	814,49	648,91	M0 > M1 > M2
	<i>s</i>	221,70	824,81	688,15	

Tabela 2: Médias aritméticas e desvio padrão da CCS dos tratamentos do grupo B, em cada um dos momentos ($p \leq 0,05$):

Grupos		<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>Interpretação estatística</i>
Zinco (1B)	média	515,73	288,21	116,29	M0 < M1 > M2
	<i>s</i>	721,83	200,68	86,77	
Vit. E (2B)	média	242,66	289,7	286,93	M0 > (M1>M2)
	<i>s</i>	426,74	372,44	373,76	
Controle (3B)	média	179,93	252,36	189,79	M0 < M1 < M2
	<i>s</i>	284,36	207,12	184,93	

Tabela 3: Comparação entre as médias e desvio padrão da CCS do momento zero (M0) dos grupos A e B:

	Grupo A	Grupo B	<i>Interpretação estatística</i>
Média	571,76	312,77	GA > GB
<i>s</i>	340,39	223,13	GA > GB

6. DISCUSSÃO

Ao analisar os grupos sob o ponto de vista número total de células somáticas, notamos que já no momento zero, a fazenda A mostra CECS maior que a do grupo B. Como o intuito deste trabalho é comparar a higiene e a contagem de células somáticas entre duas propriedades diferentes, o fator higiene não mostrou sucesso, já que no M0 a fazenda com a melhor higiene apresentou maior CECS, isto talvez se deva ao efeito do bezerro ao pé, não só no apoio, como posteriormente à ordenha, quando eles completam sua alimentação mamando ao pé da vaca (CARVALHO *et al*, 2007).

A literatura relata que vacas com bezerro ao pé apresentam menor característica de mastite (CARVALHO *et al*, 2007) e como se sabe, a contagem de células somáticas é um dos métodos mais importantes na demonstração da qualidade do leite (MÜLLER, 2002; PAULA *et al*, 2004), inclusive quando há mastite há aumento da CCS, embora nem todo aumento dessas células correspondam a processos infecciosos (LANGONI, 2000; MÜLLER, 2002; SILVEIRA, 2005; WINDIG *et al*, 2005).

Como foi observado, o grupo B apresentou menor número de células na CECS, assim, pode-se inferir que há menor descamação celular ou que há menor recuperação dessas células no momento da colheita. Neste grupo, apesar de ter uma ordenha com menor higiene, deveria apresentar maior contagem de células somáticas do que o grupo A, o que não ocorreu. Portanto, o “efeito bezerro” deva ser o fator que tem importância na CCS, onde há maior sucção e menor irritação (CARVALHO *et al*, 2007), já que inexistem os problemas com regulação de vácuo e pressão das ordenhadeiras e teteiras no processo de colheita mecânica.

Esta interpretação fica evidente quando se observa que em todos os momentos, a CECS da fazenda A é maior do que a fazenda B.

Quanto ao efeito da suplementação com zinco notou-se que no M1 houve uma diminuição na contagem de células somáticas nos dois grupos estudados. Este fato provavelmente se prende à menor descamação tecidual do canal do teto (RADOSTITIS, 2001) que é um efeito protetor do zinco (ABRAMS, 1965; CUNNINGHAM, 1982; PRASAD, 1983; ANDRIGUETTO, 1990; PROBST, 1999) devido a sua atuação sobre a produção da queratina do teto. Essa

queratina de revestimento do canal do teto atrai as bactérias e previne a penetração delas para dentro da mama (CRAVEN & WILLIAMS, 1985; NICKERSON, 1990), como aproximadamente 40% da queratina do canal do teto de vacas da raça holandesa é removida no processo de ordenha, ela requer contínua regeneração (CAPUCO *et al*, 1992).

A influência da vitamina E na resposta imune e o seu efeito antioxidante têm sido intensamente estudados nos últimos anos, estando associada com a ação bactericida dos neutrófilos e macrófagos (POLITIS *et al*, 1995) e estudos relacionados aos níveis suplementares e formas de administração para melhor avaliar os efeitos da suplementação de minerais e de vitaminas na prevenção e no controle da mastite (PASCHOAL *et al*, 2006).

A suplementação com vitamina E não se mostrou eficaz neste estudo, já que os animais não apresentaram redução na CCS no M1, este fato também foi observado por Paschoal *et al* (2006), apesar de ter utilizado quantidade menor de vitamina E do que o utilizado neste estudo.

Como a vitamina E é um antioxidante que protege as células da ação de radicais livres (ABRAMS, 1964; MAYNARD, 1966; BEISEL, 1982; CUNNINGHAM, 1982; POLITIS *et al*, 1995; NOCKELS, 1996; NRC, 2001; RADOSTITS *et al*, 2001; YANG *et al*, 2002; PAES *et al*, 2003; GUPTA *et al*, 2005), provavelmente o fator de descamação do teto, neste estudo, não seja a produção dessas endotoxinas e sim outro tipo de fator, já que só o zinco atuou na redução da CCS.

É concebível que a suplementação de vitamina E pode potencializar a defesa natural da glândula mamária contra patógenos da mastite, a diminuição da incidência desta inflamação durante o início do pós-parto em vacas leiteiras suplementadas com vitamina E pode ser atribuída à melhora da função dos neutrófilos (POLITIS *et al*, 1995). Neste trabalho, não foi possível determinar o que levou a vitamina E a não reduzir a CCS, uma vez que não foi realizada a dosagem sérica desta vitamina, nem realizado hemograma dos animais suplementados, fôra feita apenas a contagem eletrônica de células somáticas do leite dos animais suplementados com ela.

Como se sabe, a suplementação com a vitamina E pode potencializar determinadas respostas imunes (BEISEL, 1982; RADOSTITS *et al*, 2001) e provocar aumento na resistência às doenças (TIZZARD, 1998). Promover a

proliferação de linfócitos B, sendo o efeito mais acentuado na resposta imune primária, previne a supressão da função dos neutrófilos no período pós-parto, diminui a produção de interleucina- I e a expressão de antígenos de histocompatibilidade tipo II (MHC-II) durante a lactação, tendo papel positivo em relação à função dos monócitos (POLITITS *et al*, 1995; REDDY *et al*, 1986).

Para confirmar o efeito das suplementações, estas foram retiradas após três meses, para que se verificasse a ocorrência de efeito residual do zinco e da vitamina E, neste período notou-se que os animais suplementados com zinco apresentaram aumento contínuo do número de células somáticas, voltando a apresentar valores próximos aos do momento zero, com este resultado pode-se considerar que o zinco não possui efeito residual, como os animais tratados com vit. E não apresentaram diminuição da CCS, não se pode afirmar, neste estudo, que ela possui tal efeito, embora Hidiroglou *et al* (1988) tenham verificado a diminuição gradativa da vitamina E até 27 dias após o término do tratamento.

A associação de zinco com vitamina E não foi realizada, pois como se tratam de dois imunomoduladores, não seria possível determinar qual dos dois seria o responsável pela redução da CCS.

A suplementação na alimentação dos animais seja ela com minerais ou vitaminas sempre teve grande importância para a pecuária, devido a grande diversidade de forrageiras existentes, aos tipos de solo e sua acidez, clima e tipo de criação. Desta forma, com os resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que o fornecimento suplementar de zinco para vacas lactantes contribui de forma eficaz e barata com a redução da contagem de células somáticas, possibilitando assim, que o produtor se adeque de maneira fácil às recomendações feitas pelo Ministério da Agricultura e da Pecuária Nacional, em sua Instrução Normativa nº 51/2002 (BRASIL, 2002), para se obter a padronização do leite em nosso país.

7. CONCLUSÃO

- 1.) No que se refere à higiene em fazendas produtoras de leite, conclui-se que o efeito do bezerro ao pé da vaca tem grande interferência no resultado quanto à contagem de células somáticas;
- 2.) A suplementação com 750 mg de zinco orgânico na ração dos animais é efetiva na redução da contagem de células somáticas;
- 3.) A aplicação de 9000 UI de vitamina E a cada quinze dias, por via intramuscular, não contribuiu, neste estudo, para a redução da CCS.

8. BIBLIOGRAFIA

ABRAMS, J.T. Los elementos inorgánicos. In: **Nutrition Animal y Dietética Veterinária**, 4ª edição, editora Acribla (Zaragoza – Espana), p. 183-212, 1965

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; BRITO, J. R. F.; SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 101-105, abril/junho 2005.

ANDRIGUETTO, J. M. Os minerais na nutrição animal. In: **Nutrição animal – As bases e os fundamentos da nutrição animal**, 4ª edição, editora Nobel, p. 236-239, 1990

AZEVEDO, E. B. Deficiência de Cobre, Zinco, Selênio e Cobalto em Animais [http:// www.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/microminerais.pdf](http://www.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/microminerais.pdf) (disponível em 20/04/2006).

BALTACI, A.K.; SUNAR, F.; RASIM, M.; OZTEKIN, E. The effects of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation in tissue of ovariectomized rats. **Toxicology**, v.203, p. 77-82, 2004.

BATH, D.L. *et al* Nutrient Requirements (Mineral Elements). In: **Dairy Cattle: Principles, Practices, Problems, Profits**, 2ª edição, editora Lea and Febiger (Philadelphia) p. 181, 1978.

BEISEL, R.W. Single nutrients and immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, n. 35, p. 417-468, 1982

BENTLEY 2000 Operator's Manual. Chaska, EUA : Bentley Instruments, p.77, 1995.

BLAND, J.S. Oxidantes e Antioxidantes em Clínica Médica. **Revista de Oxidologia**, Maio/Junho, p. 22-31, 1998.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de setembro de 2002.

BOURNE, N.; WATHES, D.C.; MCGOWAN, M.; LAVEN, R. A comparison of the effects of parenteral and oral administration of supplementary vitamin E on plasma vitamin E concentrations in dairy cows at different stages of lactation. **Livestock Science**, n. 106, p. 57-64, 2007.

CAPUCO, A. V.; BRIGHT, S. A.; PANKEY, J. W.; WOOD, D. L.; MILLER, R. H.; BRITMAN, J. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. **Journal Dairy Science**, n. 75, p. 2126, 1992.

CARVALHO L.B.; AMARAL F.R.; BRITO M.A.V.P.; LANGE C.C.; BRITO J.R.F.; LEITE R.C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 1, v. 59 (disponível em <http://dx.doi.org>, doi: 101590/S0102 – 09352007000100039, acesso em 20/12/2007).

CLARK, C.K.; ANSOTEGUI, R. P.; PATERSON, J.A. Mineral nutrition of the beef cow to impact immunologic response. **Bovine- Practitioner**, n. 29, p. 30-37, 1994

CRAVEN, N; WILLIAMS, M. R. Defenses of the bovine intramammary gland against infection and prospects for their enhancement. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 10, p. 17, 1985.

CUNHA FILHO, L.F.C. **Determinação do teor de zinco no casco e soro sanguíneo, da produção de leite e contagem de células somáticas em bovinos leiteiros suplementados com *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 94f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CUNNINGHAM – RUNDLES, S. Effects of nutritional status on immunological function. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, p. 1202-1210, 1982.

DEPELCHIN, B.O.; BLODEN, S.; HOOREMANS, M.; NORFALISE, A.; ANSAY, M. Clinical and experimental modifications of plasma iron and zinc concentration in cattle. **Veterinary Record**, v. 116, p. 519-521, 1985.

GOOD, R.A.; WEST, A.; FERNANDES, G. Nutrition modulation of immune responses. **Fed. Proc.**, v. 39, p. 3098-3104, 1980.

GREEN, L. E.; SCHUKKEN, Y. H.; GREEN, M.J. On distinguishing cause and consequence: Do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count? **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, p. 74–89, 2006.

GRIFFITHS, L.M.; LOEFFLER, S.H.; SOCHA, M.T.; TOMLINSON, D.J.; JOHNSON, A.B. Effects of supplementing complexed zinc, manganese, copper and cobalt on lactation and reproductive performance of intensively grazed lactating dairy cattle on the South Island of New Zealand. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 69-83, 2007.

GUPTA, S.; GUPTA, H.K.; SONI, J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. **Theriogenology**, n. 64, p. 1273-1286, 2005.

HIDIROGLOU, M. Zinc, copper, manganese deficiencies and the ruminal skeleton: A review. **Canadian Journal Animal Science**, v. 60, p. 579-590, 1980.

HIDIROGLOU, N.; FLAME, L. A.; MCDOWELL, L.F. Blood plasm and tissue concentration of vitamin E in beef cattle influencied by supplementation of various tocopherol compounds. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 3227, 1988.

KESSLER, J.; MOREL, I.; DUFEY, P. A.; GUTZWILLER, A.; STERN, A.; GEYER, H. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass, meat and claw quality in fattening bulls. **Livestock production science**, v. 81, p. 161-171, 2003.

KINCAID, R.L. Biological availability of zinc from inorganic sources with excess dietary calcium. **Journal Dairy Science**, v.62, p. 1081-1085, 1979.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v. 3, f. 3, São Paulo, p. 57-64, 2000

LEDIC, I.L. Minerais na nutrição. In: **Manual de Bovinotecnia Leiteira – Alimentos: produção e fornecimento**. Editora Varela, p. 107-113, 2002.

LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; MERIN, U. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. **Small Ruminant Research (2007)** (disponível em <http://dx.doi.org>, doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.02.009, acesso em 03/09/2007)

MAYNARD, L.A. Os elementos inorgânicos e seu metabolismo. In: **Nutrição Animal**, 1ª edição, editora USAID (Rio de Janeiro), p. 133-201, 1966.

MILLER, J.K.; BRZEZINSK-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal Dairy Science**, v. 76, p. 2812 - 2815, 1993.

MILLER, W.J. Zinc nutrition in cattle. A review. **Journal Dairy Science**, v. 53, p. 1123-1131, 1970.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais do II sul-Leite**, Maringá – PR, UEM/CCA/DZO – NUPEL, p. 212, 2002.

NICKERSON, S.C. Defense mechanisms of the cow. In: **National mastitis council annual meeting proceedings New York**, 1990.

NOCKELS, C.F. Antioxidants improve cattle immunity following stress. **Animal Feed Science Technology**, n. 62, p. 59-68, 1996.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL **Nutrient requirements of dairy cattle**, 7ª edição, editora National Academy Press : Washington D.C., p. 381, 2001.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p.10-13, 1999.

PAES, P.R.O.; LOPES, S.T.A.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K.; LANGONI, H. Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus* **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , v. 55, n. 1, p. 15-20, 2003.

PARDO, P.E.; NETO, H.B.; CHIACCHIO, S.B. *et al* Determinação de zinco da sola do casco de bovinos leiteiros com ou sem lesões podais, suplementados ou não com levedura seca de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1501-1504, 2004.

PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A.; CUNHA, J. A. Contagem de células somáticas no leite de vacas suplementadas no pré-parto com selênio e vitamina E. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1462-1466, set/out , 2006.

PAULA, M. C.; MONARDES, H. G.; ARCE, J. E.; ANDRADE, U. V. C. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p. 1303-1308, 2004.

PITA, M.C.G.; PIBER NETO, E.; CARVALHO, P.R.; MENDONÇA JUNIOR, C.X. Efeito da suplementação de linhaça, óleo de canola e vitamina E na dieta sobre as concentrações de ácidos graxos polinsaturados em ovos de galinha. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 925-931, 2006.

POLITIS, I.; HIDIROGLOU, D.V.M; BATRA, T. R.; GILMORE, J. A.; GOREWIT, R.C.; SCHERF, H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal Veterinary Research** , v. 56, n. 2, p. 179-184, 1995.

PRADA e SILVA, L. F.; PEREIRA, A. R.; MACHADO, P.F.; SARRIÉS, G.A. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** , v. 37, n. 4, p. 330-333, 2000.

PRASAD, A. S. Clinical, biochemical and nutrition spectrum of zinc deficiency in human subjects an update. **Nutr. Rev.**, v. 41, p. 197-207, 1983.

PROBST, C.S.W. Cicatrização das feridas e regeneração de tecidos específicos. In: Slatter,D. **manual de Cirurgia de Pequenos Animais**, editora Manole, 2ª edição, v. 1, p. 74, 1999.

PULINA, G.; NUDDA, A.; BATTACONE, G.; CANNAS, A. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 255–291, 2006

RADOSTITIS, M. O; GAY, C.C.; BLOOD,D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por deficiências nutricionais In: **Clínica Veterinária: Um Tratado de**

Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos, editora Guanabara/Koogan, ed. 8, p. 1364-1379, 2001.

RAMÍREZ-BRIBIESCA, J.E.; TÓRTORA, J.L.; HUERTA, M.; HERNÁNDEZ, L.M.; LÓPEZ, R.; CROSBY, M.M. Effect of selenium-vitamin E injection in selenium deficient dairy goats and kids on the Mexican plateau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 77-84, 2005.

REBHUN, W.C. Doenças musculoesqueléticas In: **Doenças do Gado Leiteiro**, editora: Roca, p. 496-499, 2000.

REDDY, P.G. *et al* Effect of supplemental vitamin E on the immune system of calves. **Journal Dairy Science** v. 69, p. 164-171, 1986.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.J., JAIM, N.C. Number and Types of Somatic Cells in Normal and Mastitic Milk In: **Bovine Mastitis**, editora Lea and Febiger (Philadelphia), p. 94-127, 1971.

SEDDON A.S. **Funções da Vitamina E e do Selênio, no Sistema Imune dos Bovinos**. 2005. 17f. Trabalho de conclusão de curso da Graduação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SERRANO, M.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; MONTORO, V.; JURADO, J. J. Genetic analysis of somatic cell count and milk traits in Manchega ewes Mean lactation and test-day approaches. **Livestock Production Science**, v. 84, p. 1-10, 2003.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; LAGO, T. B. N.; VEIGA, D. R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 128-132, 2005.

SOMACOUNT 300 **Operator's Manual**. Chaska, EUA : Bentley Instruments, 1995. p.12.

TIZZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução, 5ª ed., São Paulo, editora Roca, 1998.

VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: **Santos, G. T.; Jobim, C. C.; Damasceno, J. C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, 2002, Maringá Anais Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.

WHITAKER, D.A.; EAYRES, H.F.; AITCHISON, K.; KELLY, J.M. No effect of dietary zinc proteinate on clinical mastitis, infection rate, recovery rate and somatic cell count in dairy cow. **The Veterinary Journal**, v. 153, p. 197-204, 1997.

WINDIG, J. J.; CALUS, M. P. L.; JONG, G.; VEERKAMP, R. F. The association between somatic cell count patterns and milk production prior to mastitis. **Livestock Production Science**, v. 96, p. 291-299, 2005

YANG, A.; BREWSTER, M.J.; LANARI, M.C.; TUME, R.K. Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissue from pasture- and grain- fed cattle. **Meat Science**, n. 60, p. 35-40, 2002.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis prentice hall** : New Jersey, 718p., 1996.

9. TRABALHO CIENTÍFICO:

Trabalho enviado para a revista “**Ciência Rural**”

UTILIZAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA E NA REDUÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE BOVINO.

Ana Carolina Fabro Zoccal Garcia⁴, Simone Biagio Chiacchio⁵

Resumo:

A contagem de células somáticas no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, diretamente, como indicadora da produção higiênica do leite. Por este motivo, este trabalho tem como objetivo avaliar se há redução na contagem de células somáticas no leite de vacas leiteiras suplementadas com vitamina E. Foram utilizadas 48 vacas oriundas de duas fazendas de leite tipo “C” do município de Botucatu-SP. Estes animais foram divididos em dois subgrupos (1- suplementados com 9000UI de vitamina E e 2- não suplementadas), amostras de leite

⁴ Pós - graduanda da área de Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Botucatu – Universidade Estadual Paulista. Departamento de Clínica Veterinária. CEP 18618-000 – Botucatu – SP, Brasil. E-mail: carolfabro@hotmail.com

⁵ Prof. Ass. Dr. da área de Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Botucatu – Universidade Estadual Paulista. Departamento de Clínica Veterinária. CEP 18618-000 – Botucatu – SP, Brasil. E-mail: chiacchios@fmvz.unesp.br

dos quatro tetos foram coletadas quinzenalmente em três momentos (M0-antes suplementação, M1-durante suplementação, e M2- após término suplementação), estas eram enviadas ao NUPEMAS da FMVZ Unesp-Botucatu, para determinação da contagem de células somáticas (CCS). Os animais suplementados com vitamina E não apresentaram redução na contagem de células somáticas.

Palavras chave: vitamina E, contagem de células somáticas, leite, vaca.

ABSTRACT

The somatic cells counting in cattle's milk is used as an indicative factor for the quality of milk, for controlling mastitis and, indirectly, as an indicator of a hygienic milk production. For that reason, this study aims at analyzing if there was a reduction in somatic cells counting in the dairy cattle's milk, whose animals were supplemented with vitamin E. An amount of 48 cows were study. They derived from two dairy farms in the Botucatu town, São Paulo, which produces type "C" milk. The animals were divided into 2 (two) treatments groups (1 - supplemented with 9000UI of the vitamin E and 2 – non supplemented). Samples of milk were biweekly collected, in three different periods (M0 - before supplementing, M1 -during supplementing and M2 - after supplementing). Such samples were sent to NUPEMAS of FMVZ, at UNESP - Botucatu, in order to determine the somatic cells counting (SSC). The animals which were supplemented with vitamina E not presented reduction in somatic cells counting.

Key words: vitamin, somatic cells counting, milk, cow.

1. Introdução:

O sistema agro-industrial do leite, devido a sua enorme importância social, é um dos mais importantes do país. A atividade é praticada em todo o território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional. Três importantes fatores marcaram o setor leiteiro nacional, principalmente na última década: o aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo dos preços recebidos pelos produtores (VILELA *et al*, 2002).

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporciona nutrientes e proteção imunológica para o neonato. Além de suas propriedades nutricionais, o leite oferece elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura, como o ácido linoleico conjugado, esfingomiélin, ácido butírico, β caroteno, vitaminas A e D (MÜLLER, 2002).

De modo geral o controle da qualidade do leite nas últimas décadas tem se restringido à prevenção de adulterações do produto “in natura” baseada na determinação da acidez, índice crioscópico, densidade, percentual de gordura e extrato seco desengordurado. A contagem global de microrganismos aeróbios mesófilos (indicadores de qualidade microbiológica do produto) tem sido utilizada somente para leite cru do tipo A e B (OLIVEIRA *et al*, 1999).

A qualidade do leite “in natura” é influenciada por diversas variáveis, entre as quais se destacam fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite. Uma das causas que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite, é a mastite, acompanhada por um aumento na contagem de células somáticas (CCS) no leite (MÜLLER, 2002).

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada na sua grande maioria por bactérias, é uma doença que causa grande prejuízo à pecuária leiteira. No entanto a maior preocupação do produtor de leite é a mastite subclínica, que não pode ser diagnosticada pela observação visual do úbere do animal e do leite, e sim pela presença de elevadas contagens de células somáticas no leite (LANGONI, 2000).

A contagem de células somáticas no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, indiretamente, como indicadora da produção higiênica do leite (SMITH (1996), *apud* SILVEIRA *et al*, 2005; MÜLLER, 2002; WINDIG *et al*, 2005).

Muito se tem discutido sobre os padrões de CCS e sua importância para assegurar a higiene e qualidade do leite. Segundo Godkin (2000) *apud* Silveira *et al* (2005), ainda não existe regulamentação para a CCS do leite no comércio internacional, entretanto alguns países adotaram limites máximos de CCS como parte do padrão nacional de regulamentação. No Canadá e nos Estados Unidos os padrões são de, respectivamente, 500.000 cel/mL de leite e 750.000 cel/mL de leite e na União Européia, é de 400.000 cel/mL de leite. No Brasil, em razão das grandes diferenças regionais, para implantação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite foram estabelecidos, inicialmente, padrões acima dos limites aceitáveis pelos países acima citados (SILVEIRA *et al*, 2005).

Altas contagens de células somáticas indicam presença de mastite, vacas sadias apresentam contagem de células somáticas que podem variar de 50.000 a 200.000 células/mL de leite (LANGONI, 2000).

Vários testes são utilizados para se realizar a contagem de células somáticas no leite, estes são divididos em testes indiretos, tais como o WMT (Wisconsin Mastitis Test), CMT (California Mastitis Test), e testes diretos como a CECS (Contagem eletrônica de

células somáticas), e a contagem microscópica direta em lâmina (LANGONI, 2000; SERRANO *et al*, 2003; PAULA *et al*, 2004; SILVEIRA *et al*, 2005; WINDIG *et al*, 2005).

A vitamina E é um antioxidante que evita lesão oxidativa de lipídios sensíveis da membrana e diminui a formação de hidroperóxido. Tem um papel central na proteção de membranas celulares contra a lipoperoxidação, especialmente membranas ricas em lipídios insaturados, como as mitocôndrias do retículo endoplasmático e as plasmáticas. Ela estimula macrófagos e linfócitos, melhorando a resposta imune (PAES *et al*, 2003; PASCHOAL *et al*, 2006).

2. Materiais e Métodos

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, variedade preto e branco, e 24 vacas da raça Girolanda, provenientes de duas fazendas produtoras de leite do Município de Botucatu, todas com idade variando entre 5-8 anos e com 20-35 dias de lactação.

2.2 GRUPOS

Os animais foram divididos em dois grupos conforme sua procedência, da seguinte maneira:

GRUPO A: 24 vacas leiteiras da raça Holandesa, variedade Preta e Branca; pertencentes a uma fazenda produtora de leite tipo “C”, com duas ordenhas diárias e, esta mecânica. Todos os animais ao saírem da sala de ordenha eram encaminhados ao barracão de arração com cocho em canzil onde recebiam ração.

GRUPO B: 24 vacas da raça Girolanda, provenientes de uma fazenda produtora de leite tipo “C”, com ordenha manual e uma ordenha diária. Os animais eram amarrados em mourões de madeira com cocho individual, onde era colocada polpa cítrica para que os animais se mantivessem calmos durante a retirada de leite.

Estes dois grupos foram subdivididos em 2 subgrupos, como se segue abaixo:

SUBGRUPO 1A: composto de 12 vacas que foram suplementadas quinzenalmente com 10 mL de Vitamina E⁶ por via intramuscular, dose equivalente a 9000 UI, com uma seringa de 10 mL e agulha hipodérmica 40 X 12, descartáveis, durante 3 (três) meses.

SUBGRUPO 2A: grupo controle, composto de 12 vacas, sem suplementação.

SUBGRUPO 1B: composto de 12 vacas que foram suplementadas quinzenalmente com 10 mL de Vitamina E³ por via intramuscular, dose equivalente a 9000 UI, com uma seringa de 10 mL e agulha hipodérmica 40 X 12, descartáveis, durante 3 (três) meses.

SUBGRUPO 2B: grupo controle, composto de 12 vacas, sem suplementação.

2.3 COLHEITA DO MATERIAL

O experimento foi realizado por sete meses, no período de Abril a Outubro de 2007.

Para a colheita de material foram determinados três momentos:

MOMENTO ZERO (M0): colheita quinzenal das amostras de leite para contagem eletrônica de células somáticas de todos os animais, dos dois grupos, durante os dois primeiros meses, antes da administração dos suplementos;

⁶ Monovin E® - Bravet

MOMENTO UM (M1): colheita quinzenal das amostras de leite para contagem eletrônica de células somáticas de todos os animais, dos dois grupos, durante os três meses da administração dos suplementos;

MOMENTO DOIS (M2): colheita quinzenal das amostras de leite para contagem eletrônica de células somáticas de todos os animais, dos dois grupos, durante os dois meses posteriores ao término da administração dos suplementos;

Após o descarte dos três primeiros jatos de leite, era coletada uma amostra resultante da mistura do leite dos quatro tetos de cada vaca, onde cada amostra correspondia a 50mL, que depois de colhidas eram acondicionadas em tubos plásticos próprios para contagem eletrônica de células somáticas, contendo 2 pastilhas de conservante Bronopol⁷ e homogeneizadas. Os tubos eram identificados com o número do animal. O material era então enviado ao Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS), da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Botucatu no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, no Distrito de Rubião Júnior, para realização da CECS em aparelho Somacount 300®⁸.

O projeto foi examinado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMVZ – UNESP- Botucatu.

⁷ Bronopol (2-bromo 2- nitro propano – 1,3-diol)

⁸ Bentley Instruments Inc.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a contagem de células somáticas foi utilizada a análise não paramétrica com aplicação do teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos com cada momento (ZAR, 1996). O pacote estatístico utilizado foi BioEstat 4.0 (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao ser realizada a análise estatística dos dados, observou-se que em ambos grupos (A e B), os animais não apresentaram redução estatisticamente significativa na contagem de células somáticas (Tabelas 1-3).

Ao analisar os grupos sob o ponto de vista número total de células somáticas, notamos que já no momento zero, a fazenda A mostra CECS maior que a do grupo B. Como o intuito deste trabalho é comparar a higiene e a contagem de células somáticas entre duas propriedades diferentes, o fator higiene não mostrou sucesso, já que no M0 a fazenda com a melhor higiene apresentou maior CECS, isto talvez se deva ao efeito do bezerro ao pé, não só no apoio, como posteriormente à ordenha, quando eles completam sua alimentação mamando ao pé da vaca (CARVALHO *et al*, 2007).

A literatura relata que vacas com bezerro ao pé apresentam menor característica de mastite (CARVALHO *et al*, 2007) e como se sabe, a contagem de células somáticas é um dos métodos mais importantes na demonstração da qualidade do leite (MÜLLER, 2002; PAULA *et al*, 2004), inclusive quando h'á mastite há aumento da CCS, embora nem todo aumento dessas células correspondam a processos infecciosos (LANGONI, 2000; MÜLLER, 2002; SILVEIRA, 2005; WINDIG *et al*, 2005).

Como foi observado, o grupo B apresentou menor número de células na CECS, assim, pode-se inferir que há menor descamação celular ou que há menor recuperação dessas células no momento da colheita. Neste grupo, apesar de ter uma ordenha com menor

higiene, deveria apresentar maior contagem de células somáticas do que o grupo a, o que não ocorreu. Portanto, o “efeito bezerro” deva ser o fator que tem importância na CCS, onde há maior sucção e menor irritação (CARVALHO *et al*, 2007), já que inexistem os problemas com regulagem de vácuo e pressão das ordenhadeiras e teteiras no processo de colheita mecânica.

Esta interpretação fica evidente quando se observa que em todos os momentos, a CECS da fazenda A é maior do que a fazenda B.

A influência da vitamina E na resposta imune e o seu efeito antioxidante têm sido intensamente estudados nos últimos anos, estando associada com a ação bactericida dos neutrófilos e macrófagos (POLITIS *et al*, 1995) e estudos relacionados aos níveis suplementares e formas de administração para melhor avaliar os efeitos da suplementação de minerais e de vitaminas na prevenção e no controle da mastite (PASCHOAL *et al*, 2006).

A suplementação com vitamina E não se mostrou eficaz neste estudo, já que os animais não apresentaram redução na CCS no M1, este fato também foi observado por Paschoal *et al* (2006), apesar de ter utilizado quantidade menor de vitamina E do que o utilizado neste estudo.

Como a vitamina E é um antioxidante que protege as células da ação de radicais livres (ABRAMS, 1964; MAYNARD, 1966; BEISEL, 1982; CUNNINGHAM, 1982; POLITIS *et al*, 1995; NOCKELS, 1996; NRC, 2001; RADOSTITS *et al*, 2001; YANG *et al*, 2002; PAES *et al*, 2003; GUPTA *et al*, 2005), provavelmente o fator de descamação do teto, neste estudo, não seja a produção dessas endotoxinas e sim outro tipo de fator, já que só o zinco atuou na redução da CCS.

É concebível que a suplementação de vitamina E pode potencializar a defesa natural da glândula mamária contra patógenos da mastite, a diminuição da incidência desta

inflamação durante o início do pós-parto em vacas leiteiras suplementadas com vitamina E pode ser atribuída à melhora da função dos neutrófilos (POLITIS *et al*, 1995). Neste trabalho, não foi possível determinar o que levou a vitamina E a não reduzir a CCS, uma vez que não foi realizada a dosagem sérica desta vitamina, nem realizado hemograma dos animais suplementados, fôra feita apenas à contagem eletrônica de células somáticas do leite dos animais suplementados com ela.

Como se sabe, a suplementação com a vitamina E pode potencializar determinadas respostas imunes (BEISEL, 1982; RADOSTITS *et al*, 2001) e provocar aumento na resistência às doenças (TIZZARD, 1998). Promover a proliferação de linfócitos B, sendo o efeito mais acentuado na resposta imune primária, previne a supressão da função dos neutrófilos no período pós-parto, diminui a produção de interleucina- I e a expressão de antígenos de histocompatibilidade tipo II (MHC-II) durante a lactação, tendo papel positivo em relação à função dos monócitos (POLITITS *et al*, 1995; REDDY *et al*, 1986).

A suplementação na alimentação dos animais seja ela com minerais ou vitaminas sempre teve grande importância para a pecuária, devido a grande diversidade de forrageiras existentes, aos tipos de solo e sua acidez, clima e tipo de criação. Desta forma, com os resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que o fornecimento suplementar de zinco para vacas lactantes contribui de forma eficaz e barata com a redução da contagem de células somáticas, possibilitando assim, que o produtor se adeque de maneira fácil às recomendações feitas pelo Ministério da Agricultura e da Pecuária Nacional, em sua Instrução Normativa nº 51/2002 (BRASIL, 2002), para se obter a padronização do leite em nosso país.

5. CONCLUSÃO

Com este trabalho pode-se concluir que a aplicação de 9000 UI de vitamina E a cada quinze dias, por via intramuscular, não contribuiu, neste estudo, para a redução da CCS do leite de bovinos.

6. BIBLIOGRAFIA

ABRAMS, J.T. Los elementos inorgânicos. In: **Nutrition Animal y Dietética Veterinária**, 4ª edição, editora Acribla (Zaragoza – Espana), p. 183-212, 1965

ANDRIGUETTO, J. M. Os minerais na nutrição animal. In: **Nutrição animal – As bases e os fundamentos da nutrição animal**, 4ª edição, editora Nobel, p. 236-239, 1990

BRASIL Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de setembro de 2002.

BEISEL, R.W. Single nutrients and immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, n. 35, p. 417-468, 1982

CUNNINGHAM – RUNDLES, S. Effects of nutritional status on immunological function. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, p. 1202-1210, 1982.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v. 3, f. 3, São Paulo, p. 57-64, 2000

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais do II sul-Leite**, Maringá – PR, UEM/CCA/DZO – NUPEL, p. 212, 2002.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL **Nutrient requirements of dairy cattle**, 7ª edição, editora National Academy Press : Washington D.C., p. 381, 2001.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p.10-13, 1999.

PAULA, M. C.; MONARDES, H. G.; ARCE, J. E.; ANDRADE, U. V. C. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p. 1303-1308, 2004.

PROBST, C.S.W. Cicatrização das feridas e regeneração de tecidos específicos. In: Slatter,D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**, editora Manole, 2ª edição, v. 1, p. 74, 1999.

RADOSTITIS, M. O; GAY, C.C.; BLOOD,D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por deficiências nutricionais In: **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**, editora Guanabara/Koogan, ed. 8, p. 1364-1379, 2001.

SERRANO, M.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; MONTORO, V.; JURADO, J. J. Genetic analysis of somatic cell count and milk traits in Manchega ewes Mean lactation and test-day approaches. **Livestock Production Science**, v. 84, p. 1-10, 2003.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; LAGO, T. B. N.; VEIGA, D. R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 128-132, 2005.

VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: Santos, G. T.; Jobim, C. C.; Damasceno, J. C. **Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, 2002, Maringá. Anais... Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.

WINDIG, J. J.; CALUS, M. P. L.; JONG, G.; VEERKAMP, R. F. The association between somatic cell count patterns and milk production prior to mastitis. **Livestock Production Science**, v. 96, p. 291-299, 2005

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis prentice hall** : New Jersey, 718p., 1996.

Tabela 1: Médias aritméticas e desvio padrão da CCS dos tratamentos do grupo A, em cada um dos momentos ($p \leq 0,05$):

Grupos		<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>Interpretação estatística</i>
Vit. E (2A)	média	491,01	1056	818,25	$M0 > (M1 > M2)$
	<i>s</i>	417,08	758,24	908,05	
Controle (3A)	média	253,97	814,49	648,91	$M0 > M1 > M2$
	<i>s</i>	221,70	824,81	688,15	

Tabela 2: Médias aritméticas e desvio padrão da CCS dos tratamentos do grupo B, em cada um dos momentos ($p \leq 0,05$):

Grupos		<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>Interpretação estatística</i>
Vit. E (2B)	média	242,66	289,7	286,93	$M0 > (M1 > M2)$
	<i>s</i>	426,74	372,44	373,76	
Controle (3B)	média	179,93	252,36	189,79	$M0 < M1 < M2$
	<i>s</i>	284,36	207,12	184,93	

Tabela 3: Comparação entre as médias e desvio padrão da CCS do momento zero (M0) dos grupos A e B:

	Grupo A	Grupo B	Interpretação estatística
Média	372,49	211,3	$GA > GB$
<i>s</i>	319,39	355,55	$GA > GB$