

MASTITE BOVINA SOB NANOCONTROLE: A PRÓPOLIS NANOESTRUTURADA COMO NOVA PERSPECTIVA DE TRATAMENTO PARA REBANHOS LEITEIROS ORGÂNICOS

Marcella Zampoli Troncarelli¹
Humberto de Mello Brandão²
Juliana Carine Gern²
Alessandro de Sá Guimarães²
Helio Langoni³

RESUMO

A produção orgânica de leite preconiza o uso de medicamentos a base de fitoterapia e homeopatia para o controle da mastite nos rebanhos, em detrimento da administração de antimicrobianos alopatícos convencionais. No entanto, existem escassas opções de ativos disponíveis para este fim. Considerando que a própolis apresenta ação bactericida e trata-se de um composto permitido em sistemas orgânicos de produção leiteira, pesquisadores brasileiros desenvolveram a própolis nanoestruturada, produto promissor para o tratamento intramamário de mastite. Infere-se que a nanoestrutura apresente melhor eficácia antimicrobiana e menor irritabilidade para a glândula mamária, tendo em vista que estudos prévios *in vitro*, realizados frente a estirpes de referência, apresentaram excelentes resultados. Estudos *in vivo* estão sendo realizados para avaliar a inocuidade e a eficácia de uma formulação de própolis nanoestruturada no tratamento intramamário de casos de mastite bovina em rebanhos leiteiros orgânicos. Caso se comprove a eficácia e inocuidade da formulação, estima-se que em breve a mesma possa ser direcionada para produção em escala industrial/comercial, atendendo especialmente à demanda de sistemas orgânicos de produção leiteira.

Palavras-chave: vacas, mastite, nanotecnologia, própolis, tratamento.

BOVINE MASTITIS UNDER NANOCONTROL: NANOSTRUCTURED PROPOLIS AS A NEW PERSPECTIVE OF TREATMENT FOR ORGANIC DAIRY CATTLE

ABSTRACT

Organic dairy farms are supposed to use only phytotherapeutical and homeopatical actives for mastitis control in cows. However, there are a low number of actives available for this application. Considering the bactericide action of the propolis and the fact that this substance is allowed in organic dairy farms, Brazilian researches developed the nanostructured propolis, a promissor product for intramamary treatment against mastitis. It is expected that this nanostructure presents better antimicrobial effects and lower irritability for mammary glands, considering that the previous *in vitro* studies done against bacterial reference strains showed excellent results. *In vivo* studies are being conducted to evaluate the safety and efficacy of a nanostructured propolis formulation in dairy organic farms. If the expectations regarding the safety and efficacy of the nanostructured propolis be confirmed, betimes the final formulation may be directed for industrial production, especially attending the demands of dairy farms organic systems.

Keywords: cows, mastitis, nanotechnology, propolis, treatment.

¹ Pós-doutoranda em Nanotecnologia aplicada ao controle da mastite e à qualidade do leite, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

² Laboratório de nanotecnologia aplicada à saúde e produção animal, EMBRAPA Gado de Leite - Juiz de Fora-MG

³ Professor Titular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

MASTITIS BOVINA BAJO CONTROL: EL PROPÓLEO NANOESTRUCTURADO COMO UNA NUEVA PERSPECTIVA DE TRATAMIENTO PARA GANADO LECHERO ORGÁNICO

RESUMEN

La producción orgánica de leche pregona el uso de fitoterapéuticos y homeopatía para el control de la mastitis en el ganado, en detrimento de la administración de antimicrobianos alopatícos convencionales. Sin embargo, las opciones de sustancias activas disponibles para este fin son todavía escasas. Considerando que el propóleo tiene efecto bactericida y se trata de un compuesto permitido en sistemas orgánicos de producción lechera, investigadores brasileños desarrollaron el propóleo nanoestructurado, producto prometedor para el tratamiento intramamario de mastitis. Se infiere que la nanoestructura presenta más eficacia antimicrobiana y menos irritabilidad para la glándula mamaria, ya que estudios previos in vitro, realizados en estirpes de referencia, presentaron excelentes resultados. Actualmente se realizan estudios in vivo para evaluar la inocuidad y la eficacia de esta formulación de propóleo nanoestructurado en el tratamiento intramamario de la mastitis bovina en ganado lechero orgánico. En el caso de que se compruebe la eficacia e inocuidad de la fórmula, la misma podrá ser direccionada para su producción en escala industrial/comercial, atendiendo especialmente a la demanda de sistemas orgánicos de producción lechera.

Palabras-clave: vacas, mastitis, nanotecnología, propóleo, tratamiento.

INTRODUÇÃO

Mastite bovina: importância, implicações econômicas e em Saúde Pública

A mastite bovina - processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de origem infecciosa - determina grave impacto no setor leiteiro, causando sérios prejuízos, tanto pelo comprometimento funcional da glândula mamária, com redução da produção de leite, como pelo descarte prematuro de fêmeas e/ou morte ocasional de animais (1,2). A etiologia predominantemente bacteriana da mastite bovina (3) determina menor rendimento industrial na produção de derivados lácteos e principalmente, sério risco à saúde pública, uma vez que as principais espécies de patógenos bacterianos causadores de mastite são produtores de toxinas, muitas delas termorresistentes, ocasionando surtos de toxi-infecções em humanos.

Devido à complexidade epidemiológica da mastite nos rebanhos, seu controle se torna difícil, especialmente em sistemas de criação pouco tecnificados, com manejo higiênico-sanitário deficitário e desprovido de assessoria técnica. Nestas situações, a administração indiscriminada de antimicrobianos para o controle das mastites nos animais tem determinado a seleção de estirpes bacterianas multirresistentes, com consequente redução do êxito terapêutico, ocorrência de mastites recidivantes / crônicas, bem como risco significativo à saúde pública.

Nesse contexto, vale ressaltar os princípios da produção orgânica de leite, que preconizam:

- 1) o uso de medicamentos a base de fitoterapia e homeopatia para o controle da mastite nos rebanhos, em detrimento da administração de antimicrobianos alopatícos convencionais;
- 2) a alimentação livre de cultivo com adubos químicos;
- 3) fornecimento aos animais de fontes alimentares de origem orgânica produzidas, em sua maior parte, na própria unidade.

Estas medidas visam a garantir a não contaminação do leite desde a produção até o envase, atendendo à demanda da sociedade por alimentos de qualidade e integridade garantidas.

Sistemas orgânicos de produção leiteira: características, importância econômica, cultural e social

Leite orgânico é o produto da pecuária leiteira orgânica, que se baseia nas premissas de exploração economicamente viável, ecologicamente correta e socialmente justa. Nesse tipo de exploração, além de os animais serem manejados sem a utilização de antimicrobianos, hormônios, vermífugos, promotores de crescimento, estimulantes de apetite, uréia e demais aditivos não autorizados, é necessário que o pecuarista esteja comprometido com a sustentabilidade da atividade, e que proporcione adequadas condições de trabalho aos seus empregados, sempre visando a excelência do produto a ser obtido. O leite orgânico difere daquele obtido na pecuária convencional por não conter resíduos químicos de qualquer espécie, possuindo mesmo sabor e valor nutritivo, podendo ser consumido puro, sob a forma de lactoderivados ou incorporado a outros produtos alimentícios. Embora sua produção não seja direcionada a um público específico, seus consumidores são, em geral, bem informados, possuem consciência ecológica e buscam a qualidade dos alimentos (4-6).

Esse tipo de leite possui maior valor agregado e, conseqüentemente, custo final mais elevado, restringindo seu consumo diário a uma parcela da população com maior poder aquisitivo. No entanto, existe uma tendência de mudança deste cenário a partir da disponibilização de tecnologias que irão contribuir para redução no custo de produção, aumento da oferta do produto no mercado e, conseqüentemente, redução do preço do leite orgânico nas prateleiras (7).

Estimativas da FAO indicam que o segmento de produtos orgânicos deverá aumentar as vendas em 30% nos países industrializados em dez anos (4). A produção de leite orgânico no Brasil está estimada em aproximadamente 5,5 milhões de litros/ano e, semelhante ao que ocorre nos países desenvolvidos, nos últimos anos, apresenta crescimento anual de 30%, constituindo um promissor subnicho de mercado. Atualmente, em muitos estados da Federação, existem propriedades que adotam o sistema de produção de leite orgânico e, em especial, uma grande concentração de produtores no Estado de São Paulo. Nesta região, por questões culturais e econômicas, destaca-se o município de Botucatu, que responde por aproximadamente cinquenta por cento da produção paulista.

Dificuldades no controle da mastite bovina em sistemas orgânicos de produção leiteira

Na produção orgânica de leite devem ser adotadas medidas higiênico-sanitárias convencionais para a profilaxia da mastite nos animais, recomendando-se a utilização de solução de iodo glicerinado associado à linhaça para a desinfecção dos tetos no pré e pós-dipping. Nos quadros de mastite clínica, indica-se o tratamento à base de homeopatia, argila e/ou fitoterapia, condutas alternativas à terapêutica com antimicrobianos. Ervas medicinais como a camomila, a tansagem, a babosa (espécie não tóxica para os animais), entre outras, são associadas ao tratamento adjuvante com massagem do úbere utilizando pomadas à base de própolis e/ou beladona (7). O tratamento geralmente é realizado de maneira empírica, sem acompanhamento técnico e não há comprovação científica de sua eficácia, inocuidade e reprodutibilidade.

Devido às reduzidas opções terapêuticas que os produtores orgânicos de leite têm para o tratamento da mastite bovina, existe importante demanda de pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos para este fim, à base de princípios ativos de origem natural (não-sintéticos), cuja eficácia e inocuidade sejam cientificamente comprovadas.

É reconhecido no meio científico que a própolis apresenta ação antimicrobiana, com índices de sensibilidade bacteriana variando de 85,2% a 100% obtidos em testes de antibiograma utilizando estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus* sp. isoladas de casos de

mastite bovina (8-12). Em estudo para avaliar diferentes opções terapêuticas para o controle de mastite causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros naturalmente infectados (13), utilizou-se formulação de própolis a 30% preparada em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%, para facilitar a difusão no parênquima mamário. Realizou-se tratamento intramamário, após ordenha completa, de manhã e à tarde, durante cinco dias, com 15 a 20 mL da formulação na dependência do tamanho da glândula mamária ou quarto afetado. Corroborando os resultados obtidos pelos mesmos autores quando do estudo da sensibilidade *in vitro* da própolis frente a diferentes amostras de *Prototheca zopfii*, obteve-se *in vivo* cura clínica e microbiológica em 84,8% dos tetos tratados. Por outro lado, apesar de resultados satisfatórios obtidos nestas pesquisas, existem poucos estudos de eficácia (*in vitro* e *in vivo*) e de inocuidade reportados na literatura científica.

Evidencia-se que a própolis trata-se de composto permitido para utilização no tratamento da mastite em bovinos criados em sistema orgânico de produção. Considerando estas características, e vislumbrando a possibilidade de desenvolver um novo produto intramamário que atendesse a demanda dos produtores de leite orgânico, a EMBRAPA Gado de Leite (Juiz de Fora-MG), em parceria com outras instituições de ensino e pesquisa brasileiros, após diversos anos de estudos utilizando o conceito de nanotecnologia, desenvolveram a própolis nanoestruturada, cuja eficácia *in vitro* apresentou-se comparativamente superior à da própolis íntegra natural frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* de referência. Durante o processo de produção e estabilização das nanopartículas, foram utilizadas moléculas anfifílicas (simultaneamente polares e apolares) biocompatíveis, e condições especiais para se obter um produto livre de álcool. Neste contexto, a nanoprópolis pode ser potencialmente menos irritativa ao tecido mamário em comparação aos extratos alcoólicos rotineiramente utilizados em formulações intramamárias para bovinos, que geralmente determinam processos inflamatórios na glândula (14). Desta forma, infere-se que o processo de nanoestruturação possibilitaria a otimização da eficácia terapêutica e inocuidade da própolis, quando administrada nos animais.

Princípio da Nanotecnologia

De acordo com a Organização Internacional de Padronização (15), nanotecnologia é definida no documento de consulta pública ISO/DTS 80004-1 (2010) para definição do marco regulatório como sendo “a aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria em escala nanométrica e, com isso, fazer uso de propriedades e fenômenos que são dependentes de tamanho e estrutura, e simultaneamente distintos daqueles associados com os átomos ou as moléculas individuais ou com os materiais na forma de agregados” (16).

Por sua vez, o Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (17) assume que a nanotecnologia não pode ter uma definição somente, dada a sua interdisciplinaridade nas áreas de química, física, biologia e engenharia (Figura 1). Devido ao grande número de definições, há ainda muita divergência sobre o tema, mas parece ser senso comum a noção de que a nanotecnologia esteja associada ao aparecimento ou mudança (aumento/diminuição) de uma característica da matéria associada à redução de escala de pelo menos uma de suas dimensões (16).

Na prática, as características físicas, químicas e biológicas de uma determinada substância são determinadas pela somatória dos fenômenos físico-químicos que atuam sobre a matéria como, por exemplo, a força gravitacional, a inércia, o atrito, o movimento Browniano, as interações eletrostáticas, as repulsões elétricas, entre outros (18). Ao avaliar essa substância na escala métrica, sabe-se que a mesma sofre ação de todos os fenômenos supracitados, embora alguns em maior intensidade que outros, como são os casos da gravidade, do atrito e da inércia que acabam por se sobrepor aos demais. Entretanto, à medida que essa substância tem seu tamanho reduzido, a importância dessas forças se modifica e, adicionalmente, sua

área superficial por unidade de massa é drasticamente aumentada. Por volta dos 100 nm, os átomos que compõem a partícula ficam mais instáveis em relação à sua forma métrica, necessitando, portanto, de uma menor quantidade de energia para separá-los (19). Com isso, a substância além de poder apresentar novas características físicas e químicas, também pode demonstrar maior reatividade e solubilidade, dependendo do meio onde se encontra. Adicionalmente, quando no interior da nanopartícula, o princípio ativo tem sua estabilidade aumentada, uma vez que permanece protegido de agentes oxidantes, enzimas ou mesmo interação química com outras moléculas (16). Este fenômeno torna-se relevante especialmente no caso de produtos desenvolvidos para o tratamento de mastite bovina, uma vez que em processos inflamatórios da glândula mamária existe uma série de alterações físico-químicas que usualmente interferem na ação dos princípios ativos convencionais.

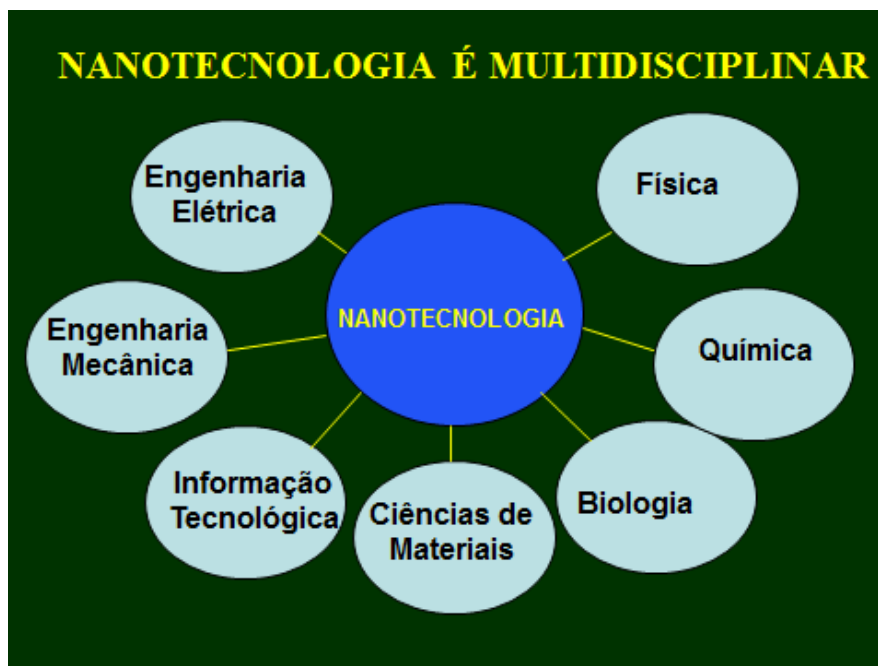


Figura 1. As diferentes interfaces da Nanotecnologia. Fonte: DURÁN, N. UMC/UNICAMP, "Nanotecnologia e Nanobiotecnologia" - Curso-QP-434 (1/08/2007). Disponível em: <http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/CURSO-NANOBIOTECH-1-2007-2.ppt>

Leite orgânico é o produto da pecuária leiteira orgânica, que se baseia nas premissas de exploração economicamente viável, ecologicamente correta e socialmente justa. Nesse tipo de exploração, além de os animais serem manejados sem a utilização de antimicrobianos, hormônios, vermífugos, promotores de crescimento, estimulantes de apetite, uréia e demais aditivos não autorizados, é necessário que o pecuarista esteja comprometido com a sustentabilidade da atividade, e que proporcione adequadas condições de trabalho aos seus empregados, sempre visando a excelência do produto a ser obtido. O leite orgânico difere daquele obtido na pecuária convencional por não conter resíduos químicos de qualquer espécie, possuindo mesmo sabor e valor nutritivo, podendo ser consumido puro, sob a forma de lactoderivados ou incorporado a outros produtos alimentícios. Embora sua produção não seja direcionada a um público específico, seus consumidores são, em geral, bem informados, possuem consciência ecológica e buscam a qualidade dos alimentos (4-6).

Esse tipo de leite possui maior valor agregado e, conseqüentemente, custo final mais elevado, restringindo seu consumo diário a uma parcela da população com maior poder aquisitivo. No entanto, existe uma tendência de mudança deste cenário a partir da disponibilização de tecnologias que irão contribuir para redução no custo de produção,

aumento da oferta do produto no mercado e, conseqüentemente, redução do preço do leite orgânico nas prateleiras (7).

Estimativas da FAO indicam que o segmento de produtos orgânicos deverá aumentar as vendas em 30% nos países industrializados em dez anos (4). A produção de leite orgânico no Brasil está estimada em aproximadamente 5,5 milhões de litros/ano e, semelhante ao que ocorre nos países desenvolvidos, nos últimos anos, apresenta crescimento anual de 30%, constituindo um promissor subnicho de mercado. Atualmente, em muitos estados da Federação, existem propriedades que adotam o sistema de produção de leite orgânico e, em especial, uma grande concentração de produtores no Estado de São Paulo. Nesta região, por questões culturais e econômicas, destaca-se o município de Botucatu, que responde por aproximadamente cinquenta por cento da produção paulista.

Dificuldades no controle da mastite bovina em sistemas orgânicos de produção leiteira

Na produção orgânica de leite devem ser adotadas medidas higiênico-sanitárias convencionais para a profilaxia da mastite nos animais, recomendando-se a utilização de solução de iodo glicerinado associado à linhaça para a desinfecção dos tetos no pré e pós-dipping. Nos quadros de mastite clínica, indica-se o tratamento à base de homeopatia, argila e/ou fitoterapia, condutas alternativas à terapêutica com antimicrobianos. Ervas medicinais como a camomila, a tansagem, a babosa (espécie não tóxica para os animais), entre outras, são associadas ao tratamento adjuvante com massagem do úbere utilizando pomadas à base de própolis e/ou beladona (7). O tratamento geralmente é realizado de maneira empírica, sem acompanhamento técnico e não há comprovação científica de sua eficácia, inocuidade e reprodutibilidade.

Devido às reduzidas opções terapêuticas que os produtores orgânicos de leite têm para o tratamento da mastite bovina, existe importante demanda de pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos para este fim, à base de princípios ativos de origem natural (não-sintéticos), cuja eficácia e inocuidade sejam cientificamente comprovadas.

É reconhecido no meio científico que a própolis apresenta ação antimicrobiana, com índices de sensibilidade bacteriana variando de 85,2% a 100% obtidos em testes de antibiograma utilizando estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus* sp. isoladas de casos de mastite bovina (8-12). Em estudo para avaliar diferentes opções terapêuticas para o controle de mastite causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros naturalmente infectados (13), utilizou-se formulação de própolis a 30% preparada em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%, para facilitar a difusão no parênquima mamário. Realizou-se tratamento intramamário, após ordenha completa, de manhã e à tarde, durante cinco dias, com 15 a 20 mL da formulação na dependência do tamanho da glândula mamária ou quarto afetado. Corroborando os resultados obtidos pelos mesmos autores quando do estudo da sensibilidade *in vitro* da própolis frente a diferentes amostras de *Prototheca zopfii*, obteve-se *in vivo* cura clínica e microbiológica em 84,8% dos tetos tratados. Por outro lado, apesar de resultados satisfatórios obtidos nestas pesquisas, existem poucos estudos de eficácia (*in vitro* e *in vivo*) e de inocuidade reportados na literatura científica.

Evidencia-se que a própolis trata-se de composto permitido para utilização no tratamento da mastite em bovinos criados em sistema orgânico de produção. Considerando estas características, e vislumbrando a possibilidade de desenvolver um novo produto intramamário que atendesse a demanda dos produtores de leite orgânico, a EMBRAPA Gado de Leite (Juiz de Fora-MG), em parceria com outras instituições de ensino e pesquisa brasileiros, após diversos anos de estudos utilizando o conceito de nanotecnologia, desenvolveram a própolis nanoestruturada, cuja eficácia *in vitro* apresentou-se comparativamente superior à da própolis íntegra natural frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* de referência. Durante o processo de produção e estabilização das nanopartículas,

foram utilizadas moléculas anfifílicas (simultaneamente polares e apolares) biocompatíveis, e condições especiais para se obter um produto livre de álcool. Neste contexto, a nanoprópolis pode ser potencialmente menos irritativa ao tecido mamário em comparação aos extratos alcoólicos rotineiramente utilizados em formulações intramamárias para bovinos, que geralmente determinam processos inflamatórios na glândula (14). Desta forma, infere-se que o processo de nanoestruturação possibilitaria a otimização da eficácia terapêutica e inocuidade da própolis, quando administrada nos animais.

Princípio da Nanotecnologia

De acordo com a Organização Internacional de Padronização (15), nanotecnologia é definida no documento de consulta pública ISO/DTS 80004-1 (2010) para definição do marco regulatório como sendo “a aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria em escala nanométrica e, com isso, fazer uso de propriedades e fenômenos que são dependentes de tamanho e estrutura, e simultaneamente distintos daqueles associados com os átomos ou as moléculas individuais ou com os materiais na forma de agregados” (16).

Por sua vez, o Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (17) assume que a nanotecnologia não pode ter uma definição somente, dada a sua interdisciplinaridade nas áreas de química, física, biologia e engenharia (Figura 1). Devido ao grande número de definições, há ainda muita divergência sobre o tema, mas parece ser senso comum a noção de que a nanotecnologia esteja associada ao aparecimento ou mudança (aumento/diminuição) de uma característica da matéria associada à redução de escala de pelo menos uma de suas dimensões (16).

Na prática, as características físicas, químicas e biológicas de uma determinada substância são determinadas pela somatória dos fenômenos físico-químicos que atuam sobre a matéria como, por exemplo, a força gravitacional, a inércia, o atrito, o movimento Browniano, as interações eletrostáticas, as repulsões elétricas, entre outros (18). Ao avaliar essa substância na escala métrica, sabe-se que a mesma sofre ação de todos os fenômenos supracitados, embora alguns em maior intensidade que outros, como são os casos da gravidade, do atrito e da inércia que acabam por se sobrepor aos demais. Entretanto, à medida que essa substância tem seu tamanho reduzido, a importância dessas forças se modifica e, adicionalmente, sua área superficial por unidade de massa é drasticamente aumentada. Por volta dos 100 nm, os átomos que compõem a partícula ficam mais instáveis em relação à sua forma métrica, necessitando, portanto, de uma menor quantidade de energia para separá-los (19). Com isso, a substância além de poder apresentar novas características físicas e químicas, também pode demonstrar maior reatividade e solubilidade, dependendo do meio onde se encontra. Adicionalmente, quando no interior da nanopartícula, o princípio ativo tem sua estabilidade aumentada, uma vez que permanece protegido de agentes oxidantes, enzimas ou mesmo interação química com outras moléculas (16). Este fenômeno torna-se relevante especialmente no caso de produtos desenvolvidos para o tratamento de mastite bovina, uma vez que em processos inflamatórios da glândula mamária existe uma série de alterações físico-químicas que usualmente interferem na ação dos princípios ativos convencionais.

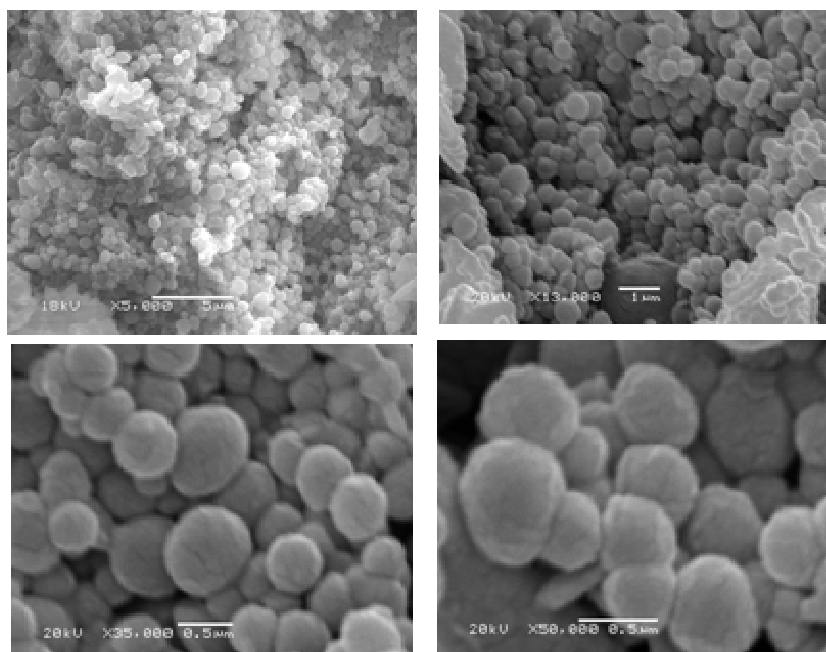


Figura 2. Microscopia eletrônica de nanopartículas. Fonte: MARCATO, P.D. E DURÁN, N., 2006. Extraído de: DURÁN, UMC/UNICAMP, “Nanotecnologia e Nanobiotecnologia” - Curso-QP-434 (1/08/2007). Disponível em: <http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/CURSO-NANOBIOTECH-1-2007-2.ppt>

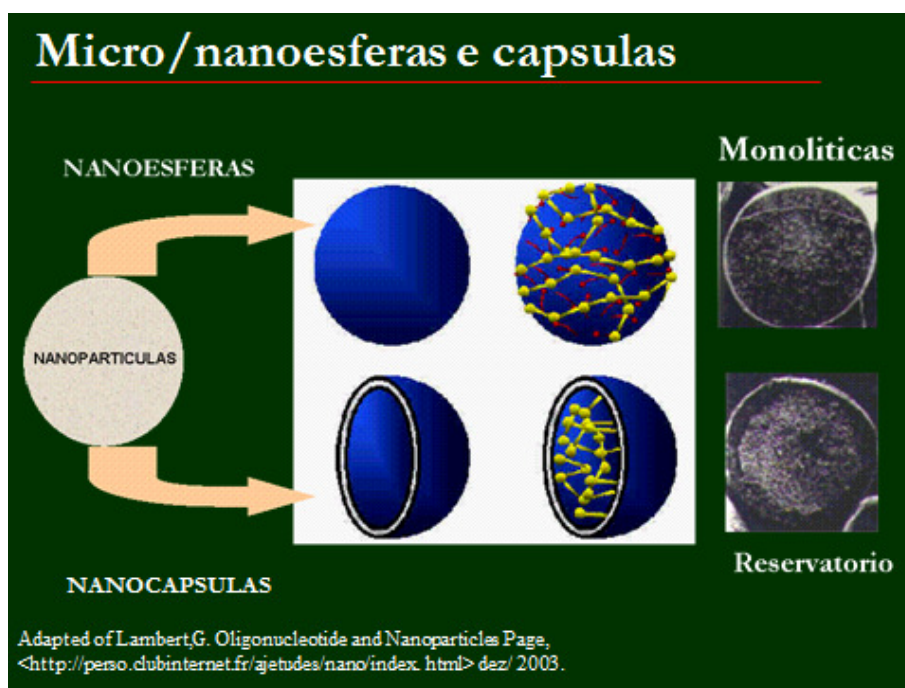


Figura 3. Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas. Fonte: DURÁN, N. UMC/UNICAMP, “Nanotecnologia e Nanobiotecnologia” - Curso-QP-434 (1/08/2007). Disponível em: <http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/CURSO-NANOBIOTECH-1-2007-2.ppt>

Como exemplo de tais benefícios, destaca-se o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o tratamento de neoplasias, determinando menor toxicidade e resistência celular ao fármaco, comparativamente aos quimioterápicos tradicionais. Em estudo realizado e 2009, avaliou-se a doxorubicina e o paclitaxel, dois princípios ativos que, quando utilizados

em conjunto no tratamento de carcinomas ovarianos, são muito eficientes no tratamento, contudo apresentam elevada toxicidade. Os pesquisadores verificaram que estes ativos, ao serem estruturados em nanopartículas lipídicas e testados contra linhagens celulares de carcinoma multirresistente, mostraram-se altamente efetivos no controle de crescimento e simultaneamente menos tóxicos nos ensaios de citotoxicidade (24).

Em outro estudo, utilizou-se nanopartículas de indometacina, um antiinflamatório não esteroide de uso rotineiro em medicina humana, com aplicações a cada oito horas. Ensaios *in vitro* indicaram que quando incorporada em nanopartículas de poli-n-vinilpirrolidona, a liberação sustentada de indometacina pode permitir a administração do medicamento a cada doze horas. Esse resultados foi obtido em função do efeito de liberação sustentada do medicamento promovido pelo nanocarreador (25).

O emprego da nanotecnologia em ativos antimicrobianos também tem apresentado resultados satisfatórios. A penicilina é o principal e mais antigo antimicrobiano representante do grupo dos β -lactâmicos, que por décadas vem sendo utilizado no tratamento de infecções bacterianas. Todavia, seu uso indiscriminado culminou na seleção de estirpes de *S. aureus* resistentes (denominados metacilina resistentes-MRSA). Um estudo possibilitou a ligação covalente de penicilina a uma cadeia de poliácido acrílico, com estruturação de nanopartículas de aproximadamente 100nm. Os pesquisadores compararam a atividade *in vitro* da molécula nanoestruturada com uma formulação convencional. Nas estirpes MRSA, a formulação nanoestruturada se mostrou mais eficaz, o que foi atribuído a uma provável proteção do princípio ativo contra ação das β -lactamases bacterianas e/ou proteção contra as proteínas ligadoras de penicilina (26).

Nanotecnologia em Medicina Veterinária

Nas áreas de produção e sanidade animal existem poucos relatos da utilização de nanoestruturas. Maior eficácia *in vitro* de estreptomicina e doxiciclina foi obtida em pesquisa, quando estes ativos foram nanoestruturados e utilizados frente a linhagens de *Brucella melitensis* (27). Este patógeno usualmente permanece no interior de macrófagos dos animais, tornando o controle farmacológico limitado e laborioso. Neste estudo, os antimicrobianos foram encapsulados em nanocomplexos de PEO-b-PAA (polímero anfifílico), proporcionando o direcionamento das nanopartículas para o interior de macrófagos murinos *in vitro*. Ao ser testada em modelos *in vivo* (murinos infectados), a formulação nanoestruturada determinou redução de 79% das unidades formadoras de colônias (UFCs) em relação ao grupo controle, valor este superior à formulação convencional ($P < 0,05$).

Nanotecnologia para o controle da mastite bovina

O uso de iodo povidine estruturado em nanoesferas de PLGA (polímero de ácido lático-glicólico) foi proposto para tratamento intramamário de mastite (28). O iodo povidine trata-se de potente e inespecífico anti-séptico, frequentemente utilizado para a desinfecção de superfícies e de pele. Os estudos se restringiram a padrões de liberação do princípio ativo *in vitro* sem que ocorresse a sua compatibilização com algum modelo biológico. Mais recentemente, na tentativa de contornar as limitações dos tratamentos convencionais de mastite estafilocócica, pesquisadores da EMBRAPA de Gado de Leite (Juiz de Fora-MG) e da UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto) desenvolveram uma formulação de uso intramamário (que se encontra em teste de fase clínica II) (29), na qual as nanopartículas são capazes de direcionar o antimicrobiano para a superfície do epitélio glandular e para o interior de polimorfonucleares, aumentando, desta maneira, a concentração do princípio ativo em compartimentos intracelulares.

Com vistas a atender à demanda do setor de produção orgânica de leite, foi desenvolvida pela EMBRAPA Gado de Leite (Juiz de Fora), em conjunto com parceiros, a nanoprópolis, que constitui uma perspectiva promissora para o controle da mastite nos rebanhos. Estudos pilotos demonstraram que a própolis nanoestruturada apresenta excelente biodisponibilidade e ação antimicrobiana, associada à adequada inocuidade e ausência de resíduos no leite, por se tratar de um composto de base natural. A figura 3 ilustra por intermédio de um microscópio de força atômica as características esféricas da nanoprópolis que está sendo avaliado em estudos in vivo, em conjunto com a FMVZ UNESP Botucatu-SP, e em breve os resultados serão divulgados.

Vantagens e potencialidades do uso de nanopartículas em Medicina Veterinária

A nanotecnologia permite não só o desenvolvimento de novos produtos, mas também a possibilidade de retrabalhar substâncias para a obtenção de melhores resultados (20).

Destacam-se como consequências práticas da nanoestruturação de uma determinada substância farmacêutica (16):

- 1) uso mais racional de medicamentos, uma vez que tanto o número de doses quanto a concentração podem ser reduzidos durante o tratamento;
- 2) “rejuvenescimento” de bases farmacêuticas já desgastadas pelo uso contínuo;
- 3) uso de novas vias de aplicação de medicamentos e vacinas;
- 4) menor geração de resíduos em produtos de origem animal.
- 5) menor estresse de aplicação medicamentosa;
- 6) redução de toxicidade e efeitos adversos de tradicionais bases farmacêuticas;
- 8) uso de novas moléculas e novos compósitos na terapêutica animal;
- 7) dentre outras perspectivas.

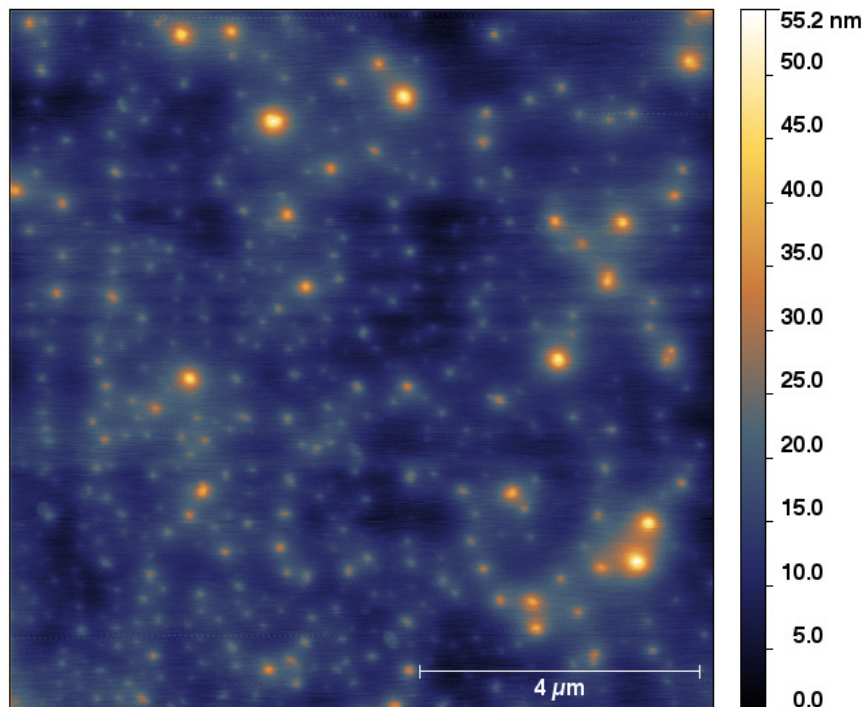


Figura 3. Fotomicroscopia de força atômica da nanoprópolis, que auxilia na sua biodisponibilidade e ação antimicrobiana. Fonte: GERN e BERNARDES-FILHO, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescente aumento da demanda mundial por alimentos implica no desenvolvimento e adoção de novas tecnologias no setor produtivo agropecuário. Considerando que o conceito moderno de pecuária sustentável leva em consideração o aumento da produtividade sem, contudo, descuidar dos aspectos ambientais, de segurança de alimento, de bem estar animal, sociais, culturais, trabalhistas, políticos e econômicos, cria-se uma janela de oportunidades para o desenvolvimento de produtos e processos inovadores que os contemple.

Com base nesta visão, para que a nanoprópolis se transforme em um produto inovador que atenda a uma clara demanda de mercado (*i.e.* produtos intramamários para o segmento orgânico), estudos *in vivo* estão sendo realizados por duas renomadas instituições de ensino e pesquisa nacionais, em parceria científica firmada e com apoio da FAPESP, para avaliar a inocuidade e a eficácia de uma formulação de própolis nanoestruturada no tratamento intramamário de casos de mastite bovina em rebanhos leiteiros orgânicos. Caso se comprove a eficácia e inocuidade da formulação patenteada, que foi premiada como terceiro melhor produto na competição mundial de produtos “Idea to Product” em Estocolmo, em novembro de 2012, a mesma poderá ser direcionada para produção em escala industrial/comercial, atendendo especialmente à demanda de sistemas orgânicos de produção leiteira.

REFERÊNCIAS

1. Mota RA, Pinheiro Júnior JW, Silva DR, Silveira NSS, Gomes SM, Silva LBG et al. 2004. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. Rev. Napgama, 7(1):10-13.
2. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2007. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 10ª ed.
3. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. 2002. Vet. Journal, 164(2):116-128.
4. Soares JPG. Produção Orgânica de Leite - Qualidade e Segurança Alimentar. Embrapa Agrobiologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/leite-seguro.html> > Acesso em: 22/11/2012.
5. Langoni H, Sakiyama DTP, Guimarães FF, Menozzi, BD, Da Silva RC. 2009. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. Pesq. Vet. Bras. 29(11):881-886.
6. Ribeiro MG, Geraldo JS, Langoni H, Lara GHB, Siqueira AK, Salerno T, Fernandes MC. 2009. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. Pesq. Vet. Bras. 29(1):52-58.
7. Castro CRT, Pires MFA, Aroeira LJ. Produção de Leite Orgânico. EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora-MG. Disponível em: < <http://www.planetaorganico.com.br/trab-leiteorganico.htm> > Acesso em: 22/11/2012.
8. Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, Chande CG, Neves IR. Efeito antimicrobiano “in vitro” da própolis. 1996. Arq. Bras. Vet. Zootec., 48:227-229.

9. Sforcin JM, Fernandes Júnior A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity 2000. *J. of Ethnopharmacol.*, 73:243-249.
10. Pinto MS, Faria JE, Message D, Cassini STA, Pereira CS, Gioso MM. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas de leite de vacas com mastite. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, 38:278-283.
11. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antim. Agents and Chemot.*, 46:1302-1309.
12. Loguercio AP, Groff ACM, Pedrozzo AF, Witt NM, Sá e Silva AM, Vargas AC. 2006. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41(2):347-349.
13. Langoni H, Domingues PF, Silva RF, Tavares HL, Mota RA, Rocha NS et al. 1995. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: Clínica e Terapêutica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*; 47:727-752.
14. Pereira LS, Botteon RCCM. Efeito da aplicação intramamária de própolis sobre a composição do leite e a contagem de células somáticas. 35º Conbravet – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. In: Anais... 19-22 de outubro de 2008. Gramado-RS.
15. ISO [International Organization for Standardization]. ISO/DTS 80004-1 Nanotechnologies-Vocabulary- Part I: Core Terms. 2010, 16p.
16. Brandão HM, Gern JC, Vicentini NM, Pereira MM, Andrade PVD. 2011. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. *Rev. CFMV*, ano XVII(53):61-67.
17. INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. Nanotecnologia, 2009.
18. Medeiros ES, Paterno LG, Mattoso LHC. 2006. Nanotecnologia. In: Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. Artiliber (ed), São Paulo. 208p.
19. Cao G. 2004. Nanostructures & nanomaterials: Synthesis, properties & applications. Imperial College Press. England. 2004, 435p. <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Ez1dYxO_ma8C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Nanostructures+%26+nanomaterials:+Synthesis,+properties+%26+applications&ots=2eI6bG4RS2&sig=IjSoeRMUGVtWNbZWudCA2maNCvw#v=onepage&q&f=false>
20. Madureira EH. 2011. Entrevista sobre desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para uso veterinário, incluindo emprego de micro e nanopartículas. *Rev. CFMV*, Ano XVII(53):5-8.
21. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Rel.*,70:1–20.
22. Couvreur P, Barrat G, Fattal E, Legrand P, Vautthier C. 2002. Nanocapsule Technology: a review. *Critical Rev. Therap. Drug Car. Sys.*, 19:99-134.

23. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*, 2:8-21.
24. Dong X, Mattingly CA, Tseng MT, Cho MJ, Liu Y, Adams VR. et al. 2009. Doxorubicin and Paclitaxel-Loaded Lipid-Based Nanoparticles Overcome Multidrug Resistance by Inhibiting P-Glycoprotein and Depleting ATP. *Cancer Res.*, 69(9):3918-3926.
25. Kuskov AN, Voskresenskaya AA, Goryachaya AV, Shtilman MI., Spandidos DA, Rizos AK. et al. 2010. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal anti-inflammatory drugs: Characterization and in vitro controlled release of indomethacin. *Int. J. Mol. Med.*, 26(1):85-94.
26. Turos E, Reddy GSK, Greenhalgh K, Ramaraju P, Abeylath SC, Jang S. et al. Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of b-lactam antibiotics against MRSA. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, v.17, p.3468–3472, 2007.
27. Seleem MN, Jain N, Pothayee N, Ranjan A, Riffle JS, Sriranganathan N. 2009. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *FEMS Microbiol. Letter*, 294:24–31.
28. Park H, Han H. 2002. Production and characterization of biodegradable povidine-iodine as intrammary disinfectant. *J. Vet. Sci.*, 64(8):739-741.
29. Mosqueira VCF, Araujo RS, Brandão HM. 2010. Composição nanoparticulada de uso animal. 2010, BR PI 1002601-0.

Recebido em: 15/02/13

Aceito em: 03/04/13