

EXTRATO DE PRÓPOLIS NO CONTROLE DE HELMINTOSES EM BEZERROS

[Extract of propolis in the control of helminthiasis in calves]

Eduardo Luiz Heinzen¹, Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto^{2*}, Júlia Gazzoni Jardim³, Regina Conceição Garcia⁴, Newton Tavares Escocard Oliveira⁴, Ricardo de Oliveira Orsi⁵

¹ Instituto de Desenvolvimento Rural do Amapá, RURAP.

^{2*} Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

³ Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF.

⁴ Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE.

⁵ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP/ Botucatu.

RESUMO - Anti-helmínticos convencionais representam preocupação crescente por parte do consumidor cada vez mais exigente quanto à ausência de resíduos medicamentosos em produtos de origem animal. Objetivou-se avaliar o extrato alcoólico de própolis (EAP) a 30% em bezerros naturalmente infestados. Foram utilizados 12 animais, apresentando peso médio de 60 kg e 90 dias de idade. Administraram-se por via oral direta, 10 mL de EAP, a cada oito horas, por quatro dias consecutivos. Os resultados foram avaliados pela pesquisa de ovos leves, pesados e contagem de ovos por grama de fezes (OPG), imediatamente antes e após tratamento, calculando-se seu percentual de redução. Procedeu-se análise estatística pelo teste unilateral dos pontos sinalizados de Wilcoxon a 5% de probabilidade. O método de Willis detectou ovos de *Trichostrongylus sp.* e *Strongyloides sp.*, e verificou-se diminuição média de 48,48% dos valores de OPG, em 83% dos animais. Dessa forma, a própolis pode representar importante terapêutica complementar para o controle de helmintoses em bovinos, principalmente para os sistemas agroecológicos, orgânicos e biológico-dinâmicos de criação, cujo uso de parasiticidas químicos é fator limitante e proibitivo para certificação.

Palavras-chave: Agroecologia, parasitas, produção orgânica, verminose

ABSTRACT - The use of conventional anthelmintic has been a growing concern among consumers who have become more and stricter toward drug residues in products of animal origin. Thus, this research aimed to evaluate the anthelmintic effect of alcoholic extract of propolis, at 30% of concentration, in naturally infected calves. Twelve calves weighting 60 kg and aging 90 days old were used. The treatments were performed by direct oral administration of 10 mL of EAP. The calves received the extract at every 8 h intervals, for five consecutive days. The results were evaluated comprising the detection of light and heavy eggs counted per gram of feces (EPG), immediately before and after treatment, calculating the percentage of reduction. For the statistical analysis, the results were evaluated by Wilcoxon unilateral test of signed points at 5% probability. *Trichostrongylus sp.* and *Strongyloides sp.* were found. After treatment, 83% of animals showed an average decrease of 48.48% per counting of EPG. Therefore, propolis may represent an important adjunctive therapy to control helminthiasis in cattle. It was particularly important in ecological organic and biological-dynamic systems of production, whose use of chemicals is prohibitive and limiting factor for certification.

Keywords: Agroecology, organic production, parasites, worms

INTRODUÇÃO

A pecuária bovina é uma atividade importante para economia brasileira. Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, as vendas de carne

bovina deverão aumentar, e de acordo com projeções do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), esse aumento ocorrerá a fim de atender o comércio mundial, que deverá comprar 2,1% a mais em relação ao ano passado (Beefpoint, 2011).

* Autor para correspondência: emellopeixoto@uenp.edu.br

O controle das parasitoses é de fundamental importância para pecuária bovina. Os prejuízos determinam grandes preocupações pelo menor ganho de peso, maior mortalidade, menor rendimento da carcaça, menor produção de leite, gastos com antiparasitários, com mão de obra, entre outros.

Esses prejuízos podem ser reduzidos mediante alterações no manejo de pastagens e animais, nutrição adequada (Basabe et al., 2009), além do uso de anti-helmínticos. Entretanto, o uso intensivo de anti-helmínticos químicos, subdoses, diagnósticos incorretos e falta de rotatividade de bases farmacológicas, têm provocado resistência de nematóides aos fármacos (Souza et al., 2008; Cezar et al., 2010; Lima et al., 2010). A vulnerabilidade destes produtos diante da capacidade de sobrevivência dos parasitas faz com que eles tenham tempo de uso pré-determinado.

Por outro lado, produtos orgânicos vêm conquistando mercado na agropecuária. Acredita-se que o uso de produtos naturais possa reduzir o desenvolvimento da resistência farmacológica, além de atingirem somente a espécie alvo, serem biodegradáveis, não causarem poluição ambiental e diminuam o problema dos resíduos (Loureiro, 2007).

Além disso, o consumidor em diferentes países exige cada vez mais alimentos naturais e de melhor qualidade. O uso de promotores de crescimento como antibióticos, está proibido em alguns países da União Européia, na avicultura e suinocultura, desde janeiro de 2006. Há necessidade de se restringir o uso de antibióticos em humanos e na produção animal.

A própolis é uma substância resinosa, coletada pelas abelhas *Apis mellifera*, de diversas partes da planta como brotos, botões florais e exsudados resinosos. Tem sido apontada ao tratamento de inúmeras enfermidades, tanto na medicina humana como na veterinária. A própolis apresenta efeitos positivos sob a saúde animal, como tratamento natural, principalmente em sistemas de produção orgânica e biológico-dinâmica (Mello-Peixoto et al., 2009) em função de suas propriedades antibacteriana (Garcia et al., 2004; Farnesi, 2007; Silva et al., 2008; Saeki et al., 2011), coccidiostáticas (Moura et al., 1998), leishmanicida (Ayres et al., 2007), e anti-helmíntica (Principal et al., 2002; Araújo et al., 2006; Castagnara et al., 2007; Loureiro et al., 2007).

Porém, a vegetação da região onde a própolis é coletada e a genética da rainha, podem influenciar sua composição, potência, alterando dessa forma

suas atividades biológicas; justificando assim, estudos regionalizados (Teixeira et al., 2006). Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o efeito anti-helmíntico do extrato alcoólico de própolis a 30%, originário da região Oeste do Paraná, em bezerros naturalmente parasitados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em Marechal Cândido Rondon – PR. Situada em latitude 24°33'40"S, longitude 54°04'12"W e altitude de 420m. O clima local é do tipo subtropical úmido, com chuvas bem distribuídas durante o ano e verões quentes. As temperaturas médias mais frias variam entre 17 e 18°C e mais quentes variam entre 28 e 29°C, sendo que a média corresponde a 22 e 23°C. Os totais anuais médios normais de precipitação pluvial para a região variam de 1.600 a 1.800 mm, com trimestre mais úmido apresentando totais entre 400 a 500 mm (IAPAR, 2011).

Foram utilizados 12 bezerros machos, da raça Holandesa e seus cruzamentos, apresentando peso médio de 60 kg e aproximadamente 90 dias de idade. Provenientes de rebanho comercial, esses animais permaneceram em piquetes formados por capim Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) e Capim-estrela-africana (*Cynodon nlemfuensis*). Recebeu ração concentrada (18% de proteína), mineralização específica para bezerros, e vacinação contra febre aftosa, raiva e clostridioses (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi* e *C. sordellii*).

Mantidos em grupo desde o nascimento até o término do presente estudo, os indivíduos foram identificados por brincos numerados, e não foram submetidos a qualquer tipo de everminação prévia, uma vez que esses animais foram doados por granjas comerciais que normalmente descartam os machos.

Os tratamentos foram realizados individualmente, por via oral direta, com auxílio de seringa descartável. Administrou-se de 10 mL de extrato alcoólico de própolis (EAP) a 30%, a cada oito horas, por quatro dias consecutivos.

A própolis foi obtida a partir de colméias localizadas na região de Marechal Cândido Rondon. Esse material foi conservado a 18°C negativos até o momento do processamento da matéria prima e preparo do extrato, que ocorreu na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon.

Para obtenção dos princípios ativos da própolis, foi utilizado como solvente álcool de cereais na proporção peso por peso, onde se pesou tanto a própolis quanto o solvente. Essa solução foi acondicionada em frasco de coloração âmbar, e durante o período de infusão foi mantido ao abrigo da luz. Durante esse período, procedendo-se agitação diária em tempo de trinta segundos, uma vez ao dia, durante 20 dias consecutivos. Posteriormente o extrato foi obtido por meio de filtração em papel filtro.

Foram realizadas análises físico-químicas no Laboratório de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu - SP. Analisou-se extrato seco (%), pH, teor de flavonóides (%), compostos fenólicos totais e propriedade antioxidante; de acordo com normativa N°. 03, de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2001).

Foram realizados exames coprológicos no momento imediatamente anterior ao tratamento e após cinco dias. Amostras de fezes de aproximadamente 15g foram coletadas individualmente, por meio de sacos plásticos, diretamente da ampola retal e posteriormente transportadas sob refrigeração, de aproximadamente 4°C, em caixa isotérmica com gelo. As análises laboratoriais foram realizadas em aproximadamente quatro horas após suas coletas. Utilizou-se o método modificado de Willis para pesquisa de ovos leves, e de Hoffmann (1987) para ovos pesados. Para contagem de ovos por grama de fezes (OPG), utilizou-se técnica de McMaster modificada (Gordon & Whitlock, 1939). Adicionalmente procedeu-se identificação dos gêneros por meio de microscopia ótica de acordo com Keith (1953).

A partir das médias aritméticas da contagem de OPG antes e após o tratamento, calculou-se seu percentual de redução. Para tanto, foram consideradas as contagens de OPG de cada unidade experimental no dia zero. Desta forma, cada animal, antes de receber o tratamento, desempenhou a função de controle, como demonstra a fórmula:

Redução (%) =

$$\frac{\text{média de OPG do dia zero} - \text{média de OPG do dia 5}}{\text{média de OPG do dia zero}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se a grande variabilidade dos componentes químicos presentes na própolis (Teixeira et al., 2006), foram realizadas análises físico-químicas do EAP. Determinou-se 13,17% de extrato seco, valor este acima do limite mínimo exigido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis, de acordo com normativa N°. 03, de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2001).

Para os teores de compostos fenólicos e flavonóides registrou-se valores de 55,5% e 1,192%, respectivamente. O mínimo de compostos fenólicos e flavonóides, exigido é 0,50% e 0,25% respectivamente (Brasil, 2001). A importância desses resultados consiste no fato de que os efeitos terapêuticos da própolis têm sido atribuídos principalmente em relação à presença desses compostos. Dessa forma, a amostra avaliada enquadra-se nos padrões de qualidade.

Com relação ao pH, determinou-se o valor de 5,08, o que também foi observado por Bezerra & Gonçalves (2008), sendo que a instrução normativa n°. 03 não estabelece um parâmetro de qualidade para essa variável (Brasil, 2001).

Adicionalmente, tem sido demonstrado que extratos de própolis possuem atividade antioxidante, seja pelo sequestro de radicais livres de oxigênio reativo, seja pela inibição de sua formação. A amostra utilizada, apresentou propriedades antioxidantes para os testes com acetato de chumbo e NaOH. Considerando-se que esta avaliação é apenas qualitativa, o regulamento técnico de identidade e qualidade da própolis estabelece exigência apenas para positividade da prova, correspondendo ao tempo de reação máximo de 22 segundos (Brasil, 2001).

Em relação aos exames coprológicos, foi possível identificar ovos de *Trichostrongylus sp.* e *Strongyloides sp.* Entretanto, nenhum resultado positivo foi registrado para o método Hoffman. Resultados semelhantes foram descritos por Neuhaus et al. (2006), que objetivando estudar a ocorrência de endoparasitoses nesta mesma região, identificaram *Trichostrongylus sp.* e *Thricuris sp.*, como principais agentes ocorrentes em bezerras leiteiras.

A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) revelou que todos os animais constituintes do presente estudo apresentaram situação de alto risco. No momento imediatamente anterior ao início do tratamento, observou-se valor médio correspondente

a 3.925 OPG. Dessa forma, e levando-se em consideração que os animais eram provenientes de rebanho comercial, e que valores acima de 300 OPG são indicativos de intervenção terapêutica (Hoffmann, 1987), bem como considerando as questões relativas ao bem estar animal, houve

necessidade de se implantar tratamento em todos os animais.

Verificou-se em 83% dos animais, redução da contagem de OPG, significativa ($P < 0,05$) para o teste unilateral dos pontos sinalizados de Wilcoxon (Tabela 1).

Tabela 1. Número absoluto de ovos por grama de fezes antes e após os tratamentos com extrato alcoólico de própolis a 30%, sua diferença (Diff) e ordem absoluta entre os pares (Ord).

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Antes tratamento	730	2300	5400	100	400	1700	700	1000	20800	1100	400	5000
Após tratamento	1150	1450	3150	1000	100	1500	00	200	9800	550	400	4500
Diff	6150	850	2250	-900	300	200	700	800	11000	550	00	500
Ord	10	7	9	-8	2	1	5	6	11	4		3

Teste de Wilcoxon a 5 % de probabilidade para diferenças entre pares ordenadas.

O percentual de redução correspondeu a 48,48%. Porém por apresentarem alto grau de infestação inicial, 75% dos animais mantiveram contagens indicativas de intervenção terapêutica. A alta infestação parasitária precoce, aos 90 dias de idade, provavelmente se deveu ao fato desses animais terem sido criados em sistema de livre pastagem coletiva, favorecendo a possibilidade de contaminação cruzada. Adicionalmente, nenhum bezerro havia sido submetido a qualquer tipo de tratamento parasiticida anterior ao início do presente estudo.

Hollands et al. (1984) administraram própolis oralmente (solução alcoólica 95%) em coelhos e constataram que houve redução na excreção de oocistos de *Eimeria sp.* Em outro trabalho, ao compararem coelhos infectados por *Eimeria magna* e *Eimeria perforans*, tratados com solução hidroalcoólica de própolis e sulfa, concluíram que os efeitos anticoccidianos da própolis foram superiores aos tratamentos com sulfa, sugerindo-a como opção no tratamento da coccidiose (Hollands et al., 1988).

Principal et al. (2002), ao testarem níveis de própolis no controle de helmintíases de ovelhas West African, verificaram que a dose de 10 mL de solução alcoólica de própolis a 3% foi a mais eficaz para a espécie.

Araújo et al. (2006) e Castagnara et al. (2007) verificaram redução de OPG nos ovinos da raça Santa Inês, ao utilizarem extrato alcoólico de própolis a 30%, proveniente da região de Marechal Cândido Rondon – PR.

Loureiro (2007) verificou que a adição de 30mg de extrato de própolis à ração de ovinos foi efetiva em reduzir o número de OPG, demonstrando seu efeito antiparasitário e a possibilidade de seu uso no controle de verminose.

Dürrewald et al. (2008) utilizaram extrato alcoólico de própolis à 33% em 20 bovinos de doze meses, naturalmente infestados por *Trichuris sp.*, *Tricostrongilos sp.* e *Ascaris sp.* Administraram em dose única, uma e duas vezes ao dia, durante três dias consecutivos, e após 30 dias do início dos tratamentos, verificaram diminuição média de 59,7% na contagem de OPG entre os animais que receberam tratamento, e aumento médio de 63,6% nos animais controle, que não receberam nenhum tipo de tratamento.

A resistência parasitária tem sido observada não só na ovinocultura (Lima et al., 2010), como na bovinocultura (Santos et al., 2008), sendo considerado um importante entrave para atividade pecuária. Dessa forma, pesquisas relacionadas a produtos naturais, se justificam pela possibilidade de evitar e ou minimizar o uso de produtos químicos, diminuindo consideravelmente a ocorrência da resistência medicamentosa.

CONCLUSÃO

A utilização do extrato alcoólico de própolis a 30% em bezerros foi eficaz para redução da contagem de ovos por grama de fezes, podendo representar importante terapêutica complementar para o controle

de helmintoses, principalmente para os sistemas agroecológicos, orgânicos e biológico-dinâmicos de criação.

REFERÊNCIAS

- Araújo J.S., Garcia R.C., Levistki I.C., Heinzen E.L. & Polese C. 2006. Incentivo a utilização da própolis como alternativa de controle de verminose em ovinos. *Anais III Congr. Bras. de Ext. Universitária*, 23-25 out., Florianópolis, SC. 1 CD-ROM.
- Ayres D.C., Marcucci M.C. & Giorgio S. 2007. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*. 102:213-220.
- Basabe J., Eiras D.F. & Romero J.R. 2009. Nutrition and gastrointestinal parasitism in ruminant production. *Arch. Zootec*. 58:131-144.
- Bezerra A.C.A. & Gonçalves G.M.S. 2008. Avaliação da ação antioxidante de substâncias ativas cosméticas destinadas à prevenção da fotoenvelhecimento cutâneo. *Anais XIII Encontro Inic. Cient. PUC*, 21-22 out., Rio de Janeiro, RJ. 1 CD-ROM.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº3 – Anexo VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 19 Jan. 2001.
- Beefpoint. CNA aposta em cenário firme para a carne em 2011. 2011. <http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/cna-aposta-em-cenario-firme-para-a-carne-em-2011-69605n.aspx> Acesso em: 26/04/2011.
- Castagnara D.D., Busarello J.J., Araújo J.S., Levistki I.C., Defante L., Garcia R.C., Braga G.C., Mello-Peixoto E.C.T., Oliveira V., Neres M.A. & Mesquita E.E. 2007. Utilização da própolis no controle de parasitas gastrointestinais em ovinos. *Anais XVII Congr. Bras. de Zoot.*, 29-01 jun., Londrina, PR. 1 CD-ROM.
- Cezar A. S., Vogel F. S. F., Sangioni L. A., Antonello A. M., Camillo G., Toscan G. & Araujo L. O. 2010. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 7:523-528.
- Dürrewald M.S., Mello-Peixoto E.C.T., Garcia R.C., Teixeira R.A., Heinzen E.L. & Orsi R.O. 2008. Utilização da própolis no controle de endoparasitas em bovinos. *Anais Congr. Bras. de Zootec.*, 26-30 maio, João Pessoa, PB. 1 CD-ROM.
- Farnesi A.P. 2007. *Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de São Paulo, Ribeirão Preto. 73p.
- Garcia R.C., Sá M.E.P., Langoni H. & Funari S.R.C. 2004. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* "in vitro". *Acta Sci. Anim. Sci.*, 26: 69-77.
- Gordon H.M. & Whitlock H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Jour. Council Sci. Ind. Res.*, 12:50-52.
- Hoffmann R.P. Diagnóstico de Parasitismo Veterinário. 1987. Editora Sulina. Porto Alegre, p. 156.
- Hollands I., Miyares C. & Sigarroa A. 1988. Análisis comparativo entre la acción del propóleo, La sulfaquinoxalina y la sulfametacina en conejos afectados con coccidiosis. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 19:99-104.
- Hollands I., Miyares C., Sigarroa A. & Pérez A. 1984. Acción del propóleo sobre la intensidad de parasitación en conejos afectados por *Eimerias intestinales*. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 15:157-163.
- IAPAR. Instituto Agrônomico do Paraná. Cartas climáticas do Paraná. <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=863>. 25 Abr. 2011.
- Keith R.K. 1953. The differentiation of the infective larvae of some common nematodes parasites of cattle. *Aust. Journ. of Zool.* 1:223-235.
- Lima W.C., Athayde A.C.R., Medeiros G.R., Lima D.A.S.D., Borburema J.B., Santos E.M., Vilela V.L.R. & Azevedo S.S. 2010. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 12:1003-1009.
- Loureiro C.M.B. 2007. *Redução de verminoses, parâmetros hematológicos e bioquímicos de cordeiros alimentados com extrato de própolis na ração*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal. 54p.
- Mello-Peixoto E.C.T., Garcia R.C., Domingues P.F. & Orsi R.O. 2009. Utilização de Própolis na Saúde Animal. *Sci. Agr. Paran.* 8:05-24.
- Moura L.P.P., Scapinello C., Martins E.N., Franco S.L. & Ribeiro M.C.M. 1998. Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocisto por grama de fezes de *Eimeria ssp* em coelhos Nova Zelândia. *R. Bras. Zoot.* 27:320-325.
- Principal J., Hernández I., D'Aubeterre R. & Rodrigues J.G. 2002. Eficacia del propóleo en el control de las helmintiasis de ovinos naturalmente infestados. *Rev. Cient.* 12:604-607.
- Saeki E.K., Mello-Peixoto E.C.T., Matsumoto L.S., Marcusso P.F. & Monteiro R.M. 2011. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. *Acta Vet Basíl.* 5:284-290.
- Silva R.B., Lima P.M., Ferraz R.E.O., Alves N.D & Feijó F.M.C. 2008. Efeito "in vitro" do extrato alcoólico de própolis e geoprópolis sobre bactérias patogênicas isoladas de leite bovino mastítico. *Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária*. 43: 48-54.
- Souza A.P., Ramos C.I., Bellato V., Sartor A.A. & Schelbauer C.A. 2008. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. *Ciênc. Rur.* 38 (5):1363-1367.
- Teixeira E. W., Message D., Negri G. & Salatino A. 2006. Bauer-7-en-3beta-yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. *Quím. Nova.* 29 (2): 245-246. doi: 10.1590/S0100-40422006000200013.