



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ATIVIDADE DA LACTOPEROXIDASE NO LEITE DE VACAS GIROLANDO**

**WANDEMBERG ROCHA FREITAS**  
Zootecnista

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO - 2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ATIVIDADE DA LACTOPEROXIDASE NO LEITE DE VACAS GIROLANDO**

**WANDEMBERG ROCHA FREITAS**

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO – 2013**

**WANDEMBERG ROCHA FREITAS**

**ATIVIDADE DA LACTOPEROXIDASE NO LEITE DE VACAS GIROLANDO**

Dissertação apresentada ao Programa e Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

**Comitê de orientação:**

Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa - Orientador

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira - Co-orientadora

Profa. Dra. Ângela Maria Vieira Batista - Co-orientadora

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO - 2013**

Ficha catalográfica

F866a Freitas, Wandemberg Rocha  
Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando /  
Wandemberg Rocha Freitas – Recife, 2013.  
52 f. : il.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa  
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia,  
Recife, 2013.  
Referências.

1. Células somáticas 2. Leite bovino 3. Lactoperoxidase  
4. Tiocianato I. Barbosa, Severino Benone Paes, orientador  
II. Título

CDD 636.21

**WANDEMBERG ROCHA FREITAS**

**ATIVIDADE DA LACTOPEROXIDASE NO LEITE DE VACAS GIROLANDO**

Dissertação defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 07 de fevereiro de 2013.

Comissão Examinadora:



---

Prof. Dra. Adriana Guim  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Departamento de Zootecnia



---

Prof. Dra. Keila Aparecida Moreira  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Unidade Acadêmica de Garanhuns



---

Prof. Dr. Kleber Régis Santoro  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Unidade Acadêmica de Garanhuns



---

Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Departamento de Zootecnia  
Presidente

**RECIFE - PE**  
**FEVEREIRO - 2013**

**DEDICO**

À minha mãe, Lenira Rocha, um exemplo de força e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela força e pela capacidade intelectual;

Aos meus pais, por tudo que sempre fizeram por mim; À minha querida irmã Walkiria Rocha, por todo incentivo e preocupação comigo; Aos meus queridos sobrinhos: Caio Fillipe, Guilherme Emanuel e Sarah Rocha, que bom que vocês existem; À minha avó, D. Marta Freitas, que se orgulhou de mim quando entrei no curso, mas não esperou que eu o concluísse, porque Deus a chamou antes;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao prof. Severino Benone, pela orientação; À profa. Keila Moreira, por tanto ter colaborado na realização desta pesquisa; Ao prof. Kleber Régis, pela colaboração com este trabalho; À profa. Ângela Batista, pela co-orientação; À profa. Adriana Guim, por participar da banca de defesa deste trabalho; Aos professores da UFRPE que me repassaram valiosos conhecimentos durante o curso;

Ao sr. Paulo Amaral, Rogério Medeiros e sua família, por terem sido tão receptivos e pela oportunidade de realização deste trabalho em suas propriedades. Aos funcionários das fazendas que prontamente se dispuseram a nos ajudar.

Ao pessoal do laboratório de Biotecnologia da UAG/UFRPE: Talita Camila, Ivaldo Almeida, Sheylla Araújo, Phillipe Tenório, Erick Galindo, Alana Emília, Patrícia Lins, Anna Carolina e Franciele Goelzer, valeu muito pela “força-tarefa”;

Ao pessoal do PROGENE: Maria Monique, Juliana Barros, Catarina Xavier, Anidene Christina, Renata Leite, Maria Araújo, Neide Leobaldo, Débora Magalhães, Ricardson Barboza e Raquel Jatobá, pelo comprometimento e auxílio;

À Carolina Notaro, Amância Patriota e João Tiago, por todo incentivo e colaboração;

Aos amigos da Pós-Graduação: Ney Lins, Juliana de Paula, Ítala Iara, Laís Jacopini, Marcelo José, Leandro Fragoso, Natália Cavalcante, Paulo Márcio, Karina Miranda, Sibebe Joise, Fábria Simone, Karla Souza, Tayara Soares e a todos os outros que participaram comigo dessa jornada;

Aos amigos: João Marcelo, Higor Borges, Marcos Teixeira, Ricardo Oliveira, Agnovaldo Sousa, Merinaldo Alves, Rilkefrance Santos e Samuel Oliveira, pela mobilização;

Às muitas pessoas que passaram pela minha vida e as que continuam comigo, que de alguma forma, em algum momento, me incentivaram, me elogiaram, me apoiaram, me ajudaram e ficaram felizes por mim e me fizeram acreditar no meu potencial.

A todos, meu muito obrigado!

*“Certo ou errado até  
A fé vai onde quer que eu vá”  
(Andar com fé, Gilberto Gil)*

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

*Wandemberg Rocha Freitas*, filho de Lenira Rocha Freitas e Melquisedeque de Barros Freitas, nasceu em Garanhuns - PE, no dia 08 de agosto de 1982. Iniciou a graduação em Zootecnia na Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco em setembro de 2005, recebendo o título de Bacharel em Zootecnia no mês de agosto de 2010. Durante a graduação trabalhou com meio ambiente, melhoramento genético animal e qualidade e comercialização de produtos de origem animal (leite, ovos e mel). Em março de 2011, iniciou as atividades no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, área de concentração em Produção Animal. Em fevereiro de 2013 submeteu-se à defesa da dissertação para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

## RESUMO

Dentre os vários requisitos essenciais para a qualidade do leite, pode-se destacar as altas contagens de bactérias totais e de células somáticas como fatores que podem influenciar negativamente na qualidade do produto, por diminuírem o rendimento industrial e poder causar danos a saúde dos consumidores. Existem no leite muitos tipos diferentes de enzimas e com isso, muitas pesquisas são realizadas com o intuito de determinar o papel biológico ou fisiológico desses compostos. A lactoperoxidase é uma enzima que ocorre naturalmente no leite e em combinação com o íon tiocianato e o peróxido de hidrogênio formam o sistema lactoperoxidase, que por sua vez, gera íons hipotiocianato, que é um composto que apresenta ação antibacteriana. O principal papel biológico da lactoperoxidase está associado à proteção do próprio leite, da glândula mamária e do trato intestinal dos lactentes contra microorganismos patogênicos que possam estar presentes no leite. A atividade da lactoperoxidase pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais, o que pode conferir a animais distintos, diferença na atividade e, conseqüentemente, maior ou menor resistência imunológica a ação de bactérias, e ainda, potencial para produzir leite com maior atividade antimicrobiana. Objetivou-se com este trabalho, verificar a atividade da lactoperoxidase e o teor de tiocianato no leite de vacas Girolando de diferentes grupos genéticos, além de estudar os fatores que podem influenciar nestas variáveis.

## ABSTRACT

Among the several essential requirements for the milk quality, can be highlighted the high counts of total bacteria and somatic cells as the factors that may negatively influence the product quality by decreasing industrial yield and can cause damage to the health of consumers. There are many different types of enzymes in the milk and therefore, many researches are carried out with the aim of determining the biological or physiological role of these compounds. The lactoperoxidase is an enzyme which occurs naturally in the milk and in combination with the thiocyanate ion and the hydrogen peroxide form the lactoperoxidase system, which in turn generates hipotiocianato ions, which is a compound that have antibacterial action. The main biological role of the lactoperoxidase is associated to the protection of the milk itself, of the mammary gland and of the intestinal tract of calves against pathogenic microorganisms that may be present in the milk. The lactoperoxidase activity may be influenced by genetic and environmental factors, which can confer to distinct animals, difference in the activity and, consequently, more or less immunological resistance to the bacteria action, and also, potential to produce milk with higher antimicrobial activity. The aim of this study was to verify the lactoperoxidase activity and the thiocyanate content in the milk from Girolando cows of different genetic groups, besides studying the factors that may influence in these variables.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### *Capítulo 2 - Atividade da lactoperoxidase e teor de tiocianato no leite de vacas Girolando*

Figura 1. Comportamento observado e predito para o tiocianato (mg/L) em função do ECS.....	43
Figura 2. Comportamento observado e predito para o ECS em função do número de dias em lactação.....	46

## LISTA DE TABELAS

### *Capítulo 2 - Atividade da lactoperoxidase e teor de tiocianato no leite de vacas Girolando*

Tabela 1. Alimentos utilizados na dieta dos animais.....	33
Tabela 2. Resumo da análise de variância para atividade da lactoperoxidase.....	39
Tabela 3. Valores médios ajustados para atividade da lactoperoxidase (U/mL), teor de tiocianato (mg/L) e ECS por grupo genético e por período de coleta.....	39
Tabela 4. Resumo da análise de variância para o teor de tiocianato.....	41
Tabela 5. Valores médios ajustados para o tiocianato (mg/L) por grupo genético e período de coleta.....	44
Tabela 6. Resumo da análise de variância para o escore de células somáticas.....	45

## SUMÁRIO

Introdução.....	13
Capítulo 1 - Referencial Teórico.....	15
Referências.....	23
Capítulo 2 - Atividade da lactoperoxidase e teor de tiocianato no leite de vacas Girolando.....	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	32
Resultados e Discussão.....	37
Conclusões.....	47
Agradecimentos.....	47
Referências.....	47

## INTRODUÇÃO

No cenário mundial de produção de leite bovino, o Brasil é o país que ocupa a quinta posição no *ranking*, com uma produção de quase 31,5 bilhões de litros de leite em 2012, onde os Estados Unidos, Índia, China e Rússia se enquadram, respectivamente, nas primeiras colocações, segundo a previsão do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USA, 2012). Para 2013, a perspectiva é que o Brasil suba uma posição nesse *ranking* produtivo, acreditando-se que aconteça um acréscimo de 2,83% até o final do ano (USA, 2012).

Devido à importância e representatividade do setor lácteo para a economia brasileira, o país criou o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL), no qual a Instrução Normativa nº 51 (IN-51), de 18 de setembro de 2002, dita exigências, determinando rígidos critérios para a produção, identidade e qualidade do leite de vaca (BRASIL, 2002). Mais tarde, em 29 de dezembro de 2011, este documento foi alterado pela instrução normativa nº 62 (IN-62), que a tornou mais adequada à realidade do país (BRASIL, 2011).

Dentre os vários requisitos essenciais para a qualidade do leite, pode-se destacar a alta contagem microbiológica como um fator que pode influenciar negativamente no processamento tecnológico, por diminuir o rendimento industrial, causar alterações que reduzem a vida de prateleira e alterar as características sensoriais dos produtos derivados (GIGANTE, 2004). Além disso, a alta contaminação por micro-organismos pode causar danos à saúde dos consumidores, devido à ação de patógenos (VILAR et al., 2012).

Outro requisito importante para a qualidade do leite é a contagem de células somáticas (CCS), no sentido que esta é um indicativo da saúde do úbere dos animais (CARNEIRO et al., 2009). De forma geral, a composição do leite de vacas que apresentam problemas de sanidade da glândula mamária é normalmente alterada, tanto pela ação direta de micro-organismos patogênicos ou de suas enzimas sobre os componentes do leite, bem como pela alteração na permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula mamária, que modifica a capacidade de síntese do tecido secretor (MACHADO et al., 2000; BYTYQI et al., 2010).

Existem no leite mais de 60 tipos diferentes de enzimas. Com isso, muitas pesquisas são realizadas com o intuito de determinar o papel biológico ou fisiológico desses compostos, bem como verificar a sua relevância na qualidade dos alimentos, processamento tecnológico e estabilidade nos produtos (ANDREWS et al., 1991).

A lactoperoxidase é uma enzima que ocorre naturalmente no leite e em combinação com o íon tiocianato e o peróxido de hidrogênio, formam um sistema conhecido como sistema

lactoperoxidase, que por sua vez, gera íons hipotiocianato, que é um composto que apresenta ação antibacteriana no leite (AL-BAARRI et al., 2012).

Assim, um leite cru que possui maior atividade da lactoperoxidase pode ter o seu tempo de conservação aumentado. Este fato pode ser muito importante em locais que apresentam deficiência ou impossibilidade de refrigeração rápida do leite, após a sua obtenção (FAO, 1999; NDAMBI et al., 2008).

Portanto, objetivou-se com esse trabalho, verificar a atividade da lactoperoxidase, quantificar os níveis de tiocianato e averiguar os fatores que os influenciam, no leite cru resfriado de animais Girolando dos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 HG, bem como estimar a correlação entre esses componentes e o número de células somáticas.

FREITAS, W. R. Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando.

## **Capítulo 1**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **ATIVIDADE DA LACTOPEROXIDASE NO LEITE DE VACAS GIROLANDO**

## **QUALIDADE DO LEITE**

Dentre os produtos de origem animal mais importantes e mais consumidos no mundo destaca-se o leite, um alimento de alto valor nutricional e que gera emprego e renda para um numeroso grupo de pessoas envolvidas nas diferentes etapas de sua cadeia produtiva. O que faz do sistema agroindustrial do leite, um dos mais importantes do Brasil, devido ao seu grande valor econômico e social (VILELA et al., 2002).

Para que a demanda por produtos lácteos continue crescente, a qualidade da matéria prima deve ser considerada como fator de alta relevância, uma vez que o mercado consumidor está cada vez mais exigente em relação à qualidade dos produtos que consome, priorizando aqueles que minimizam os riscos a saúde.

A importância atribuída ao leite e seus derivados na alimentação humana, devido as suas propriedades nutritivas, faz com que esses estejam entre os alimentos melhor avaliados, do ponto de vista qualitativo (BRITO E BRITO, 2001).

De acordo com Brito e Brito (2001), a qualidade do leite cru está relacionada com as condições higiênicas em que esse leite foi obtido e armazenado, com a sua composição química e características físico-químicas. As proporções de gordura, proteína, lactose, ureia, caseína, minerais e vitaminas determinam a qualidade composicional do leite, que pode ser influenciada diretamente pela alimentação animal, manejo e genética. Alguns fatores intrínsecos aos animais, como metabolismo, estágio de lactação, nível produtivo, escore corporal, nível de estresse ou condições de conforto também são importantes quanto à composição e quantidade de leite produzido (BRITO E BRITO, 2001).

Entretanto, o leite apresenta condições ideais para o bom desenvolvimento microbiano, devido aos nutrientes nele disponíveis, atividade de água elevada e pH próximo à neutralidade (ARCURI et al., 2006; DUMITRASCU et al., 2012).

A obtenção da matéria prima é a primeira etapa importante para a qualidade do produto, sendo nesse momento, indispensável que o leite seja obtido de animais livres de doenças e em condições higiênico-sanitárias adequadas (BRASIL, 2011). Recomenda-se, ainda, atenção especial à higienização dos indivíduos e dos equipamentos e utensílios de ordenha que entram em contato direto com os animais e o leite. Essas práticas são importantes porque a presença de resíduos químicos e possíveis contaminações por micro-organismos podem influenciar negativamente na qualidade da matéria prima (BRASIL, 2011; VILAR et al., 2012).

O resfriamento rápido do leite também é fator de suma importância, devendo ser a uma temperatura igual ou inferior a 4°C, no tempo máximo de três horas após o término da ordenha (ARCURI et al., 2006; BRASIL, 2011). A conservação do leite em temperaturas baixas é importante por inibir ou reduzir a velocidade de multiplicação de muitas espécies de micro-organismos, bem como diminuir a atividade de lipases e proteases, que podem degradar componentes essenciais à qualidade do produto (ARCURI et al., 2006).

No Brasil, na década de 90, algumas cooperativas de laticínios deram início a implementação de programas de pagamento do leite por qualidade (MÜLLER, 2002). Atualmente, essa prática é muito mais comum entre as indústrias, especialmente a partir da criação do PNQL. Em geral, os laticínios levam em consideração os resultados das amostras de leite enviadas aos laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), para fins de bonificação. A adoção do pagamento por qualidade pelas indústrias é muito significativa, pois incentiva os produtores rurais a produzir um leite mais saudável, do ponto de vista da segurança alimentar.

Dessa forma, vale enfatizar que a qualidade dos produtos lácteos é uma consequência de todas as atividades realizadas ao longo do processo produtivo, desde a obtenção do leite na fazenda, transporte, processamento tecnológico até o armazenamento (VILAR et al., 2012).

## **MASTITE E CÉLULAS SOMÁTICAS**

A mastite é uma inflamação que ocorre na glândula mamária dos animais, em resposta a penetração de micro-organismos patogênicos nesse órgão, principalmente bactérias, sendo considerada a enfermidade que mais traz prejuízos à atividade leiteira (FONSECA E SANTOS, 2000; CARNEIRO et al., 2009).

Apesar de ser uma doença que pode ser causada por mais de 150 espécies diferentes de micro-organismos, apenas algumas espécies de estafilococos, estreptococos e coliformes apresentam importância econômica e epidemiológica (KUANG et al., 2009; SHOME et al., 2011).

Quanto a sua forma de manifestação pode ser dividida em mastite clínica ou subclínica. A primeira acontece quando os animais apresentam sinais evidentes da doença, como dor e rigidez, edema e aumento da temperatura do úbere, alterações nas características do leite, como ejeção de grumos, pus ou sangue durante a ordenha. Já a mastite subclínica é caracterizada por alterações na composição do leite, como diminuição nos teores de gordura,

caseína e lactose e elevação nas proporções de Cl, Na<sup>+</sup>, proteínas do soro e CCS (FONSECA E SANTOS, 2000).

Outra classificação também pode ser utilizada, dessa vez quanto ao agente causador, que pode ser contagioso ou ambiental. Segundo Fonseca e Santos (2000), a mastite contagiosa é adquirida, quase que em sua totalidade, durante a ordenha, sendo causada por microorganismos que possuem preferência pelo interior da glândula mamária e superfície dos tetos. A mastite ambiental acomete os animais quando a microbiota que se encontra no mesmo ambiente em que os animais são criados, alcança o interior da glândula mamária. São microorganismos encontrados em locais que apresentam esterco, urina, camas orgânicas ou até mesmo no solo.

A *Escherichia coli*, por exemplo, é um dos principais agentes patogênicos associados à mastite ambiental, que pode conduzir a doença do estado agudo ao estado sistêmico grave (GÜNTHER et al., 2011). O leite cru e os produtos lácteos fabricados com leite não pasteurizado tem sido responsáveis por surtos de *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, o que representa um risco potencial para os consumidores (LITTLE et al., 2008).

O controle da sanidade da glândula mamária proposto pelas IN-51 e IN-62 está relacionado com a CCS do leite. De uma forma geral, a CCS representa todas as células presentes no leite, que inclui os leucócitos ou células brancas do sangue (linfócitos, neutrófilos e macrófagos) e as células de descamação do epitélio glandular do úbere, sendo que essas últimas nem sempre se encontram presentes, podendo chegar a uma proporção que varia de 0 a 7% do total de células (NATZKE, 1981; BRITO E BRITO, 2001).

A CCS aumenta devido à resposta à inflamação que eleva o número de células de defesa para combater a infecção nos alvéolos. Os leucócitos fazem parte dos mecanismos naturais de defesa do animal e migram do sangue para a glândula mamária sempre que ocorre alguma agressão por um agente infeccioso (BRITO et al., 1997). Portanto, o principal fator que influencia a quantidade de células somáticas no leite é a ocorrência ou não da mastite. Outros fatores como estágio de lactação, idade do animal, estação do ano e vários tipos de estresse podem influenciar a CCS, mas não tem tanta importância se a glândula mamária não estiver infectada (HARMON, 1994).

Dessa forma, um leite de qualidade também deve apresentar baixa CCS, já que esta está diretamente relacionada com a sanidade do rebanho, mais precisamente, com o nível de mastite em que se encontram os animais que estão produzindo leite.

A CCS do leite pode refletir também em perdas significativas de produção, de acordo com o nível de infecção nos animais, além de causar alterações na qualidade do produto, em

virtude da ação de lipases leucocitárias e lipoprotéicas. Com isso, a concentração de gordura no leite com elevada CCS tende a diminuir, a não ser que o declínio da produção de leite seja maior que o decréscimo da produção de gordura, o que ocasionaria concentração deste componente (PEREIRA et al., 1997). Como é o caso do trabalho realizado por Machado et al. (2000), que observaram que a partir de 1.000.000 céls./mL de leite ocorria aumento significativo na concentração de gordura, em amostras coletadas em tanques de expansão.

As caseínas, que representam 80% das proteínas do leite, é um grupo importante de proteínas de interesse da indústria que também sofre expressiva redução quando a CCS aumenta, devido à ação de proteases leucocitárias e sanguíneas (FONSECA E SANTOS, 2000; SGARBIERI, 2005; MADUREIRA et al., 2007). Por outro lado, ocorre aumento das proteínas do plasma sanguíneo no leite, em decorrência da resposta inflamatória (FONSECA E SANTOS, 2000).

Íons de cloro e sódio também podem ser encontrados em maior proporção no leite com alta CCS, já que durante a inflamação, as paredes dos vasos sanguíneos se tornam mais dilatadas e várias substâncias do sangue podem passar para o leite, juntamente com as células do sistema imune. Esse fato é negativo porque pode alterar as características sensoriais do produto (BRITO E BRITO, 2001).

## **LACTOPEROXIDASE**

A lactoperoxidase (EC.1.11.1.7) é uma enzima do grupo das oxidases, as quais estão largamente distribuídas nos sistemas biológicos. Embora seu nome aponte claramente ser de origem láctea, esta pode ser sintetizada nas glândulas mamárias, salivares, lacrimais e também pelo epitélio respiratório dos mamíferos (WOLFSON E SUMNER, 1993; EL-CHEMALY et al., 2003; BOOTS E FLORIS, 2006; FOX E KELLY, 2006).

Na glândula mamária, a lactoperoxidase é sintetizada principalmente por leucócitos polimorfonucleares e constitui uma das principais proteínas do soro do leite, apresentando atividade média superior às necessidades biológicas exigidas para que uma ótima catálise de oxirredução aconteça (KORHONEN, 1980; SHARMA E RAJ, 1999; FONTEH et al., 2002).

O principal papel biológico da lactoperoxidase está associado à proteção do próprio leite, da glândula mamária e do trato intestinal dos lactentes contra micro-organismos patogênicos que possam estar presentes no leite (KUSSENDRAGER E VAN HOOIJDONK, 2000; SEIFU et al., 2005; BOOTS E FLORIS, 2006; ATASEVER et al., 2013).

Em geral, a atividade das enzimas lácteas pode ser influenciada por inúmeros fatores, incluindo raça, idade do animal, dieta, estado nutricional, número de lactações, estágio de lactação, saúde da glândula mamária e variações sazonais (CALAMARI et al., 2005).

É comum observar o aumento da atividade enzimática e bioquímica no leite de animais que apresentam problemas de sanidade da glândula mamária, sendo esta característica também observada no caso da lactoperoxidase (KORHONEN E KAARTINEN, 1995).

Com relação à atividade da lactoperoxidase encontrada no leite, tem-se que esta varia significativamente entre as espécies de bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, camelinos e humanos. No leite bovino foram encontrados valores médios de 0,97 a 19,4 unidades/mL de leite (SEIFU et al., 2005; DUMITRASCU et al., 2012).

A lactoperoxidase é também uma das enzimas mais estáveis ao calor, assim, na indústria de laticínios, a sua presença pode ser utilizada como um indicativo de eficiência da pasteurização do leite (LEWIS E HEPPELL, 2000; FOX E KELLY, 2006; BOULARES et al., 2011). Quando o leite é submetido a uma super pasteurização (tempo e temperatura acima do recomendado) esta enzima pode ser desnaturada, portanto a temperatura aplicada nesse processamento deve ser adequada para que perdas de qualidade não aconteçam (FOX, 2003; ANDRADE et al., 2008).

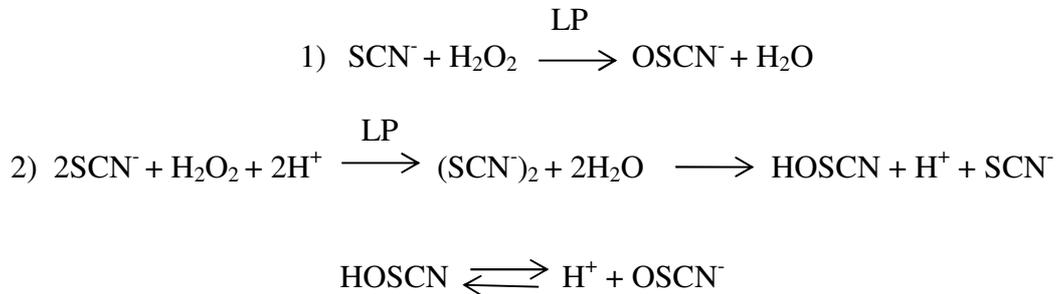
Além disso, a lactoperoxidase está associada a muitos estudos relacionados ao controle de patógenos e micro-organismos de deterioração em outros produtos agroindustriais além dos derivados lácteos, tais como, peixes, carne bovina e sucos de frutas (ELLIOT et al., 2004; SEIFU et al., 2004; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2009; BOULARES et al., 2011; MONTIEL et al., 2012;).

## **SISTEMA LACTOPEROXIDASE**

O sistema lactoperoxidase (SLP) é um mecanismo inespecífico de proteção da glândula mamária e encontra-se presente em todos os mamíferos. Este sistema compreende uma série de reações químicas e é constituído pela lactoperoxidase (LP), pelo íon tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ), proveniente do metabolismo hepático, e pelo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), derivado do metabolismo celular (SERMON et al., 2005). Para ativação do SLP são indispensáveis os três componentes (LP,  $\text{SCN}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

A ativação do SLP, conforme esquemas abaixo, é representada pela oxidação do tiocianato pelo peróxido de hidrogênio, sendo que esta oxidação é catalisada pela lactoperoxidase. Como produtos desta reação surgem o ácido hipotiocianico (HOSCN) e o íon

hipotiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ), elementos que possuem características antimicrobianas, sendo este último o mais importante, por ser produzido em maiores quantidades (ORAM E REITER, 1966; WOLFSON E SUMNER, 1993; SEIFU et al., 2005).



A ação antimicrobiana do SLP resulta na oxidação dos grupos sulfidrílicos de diversas enzimas e outras proteínas essenciais ao metabolismo microbiano (REITER E HARNULV, 1984; CAC, 1991). Esta ação altera o metabolismo das bactérias e pode ocasionar lesões ou modificações nas diversas estruturas da célula bacteriana, como parede celular, sistema de transporte ativo e passivo, enzimas glicolíticas e ácidos nucléicos, o que conseqüentemente, interfere na capacidade de multiplicação dos micro-organismos (CAC, 1991; LOPES, 2010).

A atividade mínima da enzima, para apresentar ação antimicrobiana, é relativamente baixa, da ordem de 0,02 unidades/mL, o que confere ao leite cru a possibilidade de haver esta atividade enzimática em qualquer condição (SEIFU et al., 2005).

O tiocianato é uma substância que está presente nos órgãos, fluidos e secreções dos mamíferos. A concentração do íon tiocianato no leite dependerá de suas concentrações sanguíneas podendo, assim, variar de acordo com a espécie animal, raça, dieta, sanidade da glândula mamária e aspectos fisiológicos (KUSSENDRAGER E VAN HOOIJDONK, 2000).

Alguns países permitem a adição de substâncias ao leite cru, como é o caso de Cuba e África de Sul, dentre outros, a fim de prolongar o seu tempo de conservação. Dessa forma, o *Codex Alimentarius* recomenda a adição de 14 mg/L de tiocianato de sódio no leite cru, para ativação exógena do sistema lactoperoxidase (CAC, 1991). Porém, Ponce (2012), em pesquisa realizada em países tropicais, verificou que só seria necessária a adição de 8 – 9 mg/L de tiocianato de sódio ao leite cru.

A concentração subótima de tiocianato no leite diminui bastante a eficiência do sistema e o excesso pode promover toxidez em humanos, podendo causar disfunção na tireóide (REITER E HARNULV, 1984).

No Brasil, não é permitida a utilização de nenhum tipo de aditivo ou coadjuvante ao leite cru (BRASIL, 2011). Portanto, uma das práticas que pode ser realizada para aumentar a quantidade de íons tiocianato no leite seria através da ingestão de alimentos precursores pelos animais.

O peróxido de hidrogênio utilizado no sistema lactoperoxidase pode ser gerado endogenamente no processo de fagocitose pelos leucócitos e por um conjunto de bactérias como lactobacilos, lactococos e estreptococos, sob condições aeróbias (WOLFSON E SUMNER, 1993). Porém, a baixa tensão de oxigênio no interior da glândula mamária inibe a produção do peróxido de hidrogênio, limitando a efetividade do sistema antimicrobiano dentro da glândula (SORDILLO E STREICHER, 2002).

Para fins de ativação exógena do SLP, nos locais que o permitem, a adição do  $H_2O_2$  ao leite também pode ser realizada, porém, o excesso desse composto é prejudicial, pois inibe a ação da enzima, além de causar danos a saúde humana (PÉREZ, 1987). A ativação do sistema requer quantidades mínimas do peróxido e o critério estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para ativação exógena é de 8 mg de  $H_2O_2$  por litro de leite (CAC, 1991).

O hipotiocianato produzido pela lactoperoxidase em presença do tiocianato e do peróxido de hidrogênio possui ação antimicrobiana considerada de amplo espectro, ou seja, consegue ser eficaz contra várias espécies de micro-organismos, podendo ser bactericida, contra bactérias Gram negativas, e bacteriostática, contra bactérias Gram positivas (WOLFSON E SUMNER, 1993; SEIFU et al., 2004; MIN et al., 2005; SAAD, 2008; AL-BAARRI et al., 2010). Com isso, distintas respostas à ação da enzima podem ocorrer, pois a diferença estrutural na parede celular destes dois grupos faz com que haja uma sensibilidade menor ou maior à ação da enzima, além de que pode haver produção de compostos inibidores pelas próprias bactérias, razão esta que faz com que algumas espécies de micro-organismos possam ter seu crescimento ou metabolismo inibidos, enquanto outras podem sofrer lise (WOLFSON E SUMNER, 1993; KUSSENDRAGER E VAN HOOIJDONK, 2000).

## REFERÊNCIAS

AL-BAARRI, A.N.; OGAWA, M.; VISALSOK, T.; HAYAKAWA, S. Lactoperoxidase immobilized onto various beads for producing natural preservatives solution. **Journal of Applied Food Technology**, v.1, n.1, p.4-6, 2012.

AL-BAARRI, A.N.; OGAWA, M.; HAYAKAWA, S. Scale-up studies on immobilization of lactoperoxidase using milk whey for producing antimicrobial agent. **Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture**, v.35, n.3, p.185-191, 2010.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; FERREIRA, J.M. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-enchimento e ao congelamento. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1424-1430, 2008.

ANDREWS, A.T.; OLIVECRONA, T.; BEGTSSON-OLIVECRONA, G.; FOX, P.F.; BJÖRCK, L.; FARKYE, N.Y. Indigenous enzymes in milk. In: Fox P.F. (Ed.) **Food Enzymology**. London: Ed. Elsevier, 1991. p.53-129.

ARCURI, E.F.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ATASEVER, A.; OZDEMIR, H.; GULCIN, I.; KUFREVIOGLU, O.I. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. **Food Chemistry**, v.136, p.864-870, 2013.

BOOTS, J.W., FLORIS, R. Lactoperoxidase: from catalytic mechanism to practical applications. **International Dairy Journal**, v.16, p.1272-1276, 2006.

BOULARES, M.; MANKAI, M.; HASSOUNA, M. Effect of activating lactoperoxidase system in cheese milk on the quality of Saint-Paulin cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.1, p.75-83. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 2002, seção 1, p.13-22.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 dez. 2011, seção 1, p.6-11.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JÚNIOR, E.V. **Produção de leite e Sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 61-74.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R.S.; BRITO, M.A.V.P. Sensibilidade e especificidade do *California Mastitis Test* como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.17, n.2, p.49-53, 1997.

BYTYQI, H.; GJONBALAJ, M.; HAMIDI, A.; EHMETI, H.; MUJI, S.; SHERIFI, K. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw cow milk in Kosova. **Veterinarski Arhiv**, v.80, n.2, p.173-183, 2010.

CAC. Codex Alimentarius. **Guidelines for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system**, CAC/GL 13-1991, 1991. 5p.

CALAMARI, L.; MAIANTI, M.G.; BANI, P.; SARTI, L. Seasonal variations of some enzyme activities of cow milk. **Italian Journal of Animal Science**, v.4, p.212-214, 2005.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009.

DUMITRASCU, L.; STANCIUC, N.; STANCIU, S.; RAPEANU, G. Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk – A comparative kinetic and thermodynamic study. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.47-52, 2012.

EL-CHEMALY, S.; SALATHE, M.; BAIER, S.; CONNER, G.E.; FORTEZA, R. hydrogen peroxide-scavenging properties of normal human airway secretions. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.167, p.425-430, 2003.

ELLIOT, R.M.; MCLAY, J.C.; KENNEDY, M.J.; SIMMONDS, R.S. Inhibition of foodborne bacteria by lactoperoxidase system in a beef cube system. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.73-81, 2004.

FAO. **Manual on the use of the lactoperoxidase system in milk handling and preservation**. Food and agriculture organization of the United Nations, Roma, 1999. 32p.

FONSECA, L.F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Ed. Lemos, 2000. 175p.

FONTEH, F.A.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows and goats milk throughout lactation. **Journal of Dairy Research**, v.69, p.401-409, 2002.

FOX, P.F. Significance of indigenous enzymes in milk and dairy products. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. (Ed.), **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker Inc. 2003.

FOX, P.F.; KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - Part 1. **International Dairy Journal**, v.16, p.500-516, 2006.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (Eds.). O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UFP, 2004. p.235-254.

GÜNTHER, J.; ESCH, K.; POSCHADEL, N.; PETZL, W.; ZERBE, H.; MITTERHUEMER, S.; BLUM, H.; SEYFERT, H.M. Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6)

but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, v.79, p.695–707, 2011.

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

KORHONEN, H. Potential role of the lactoperoxidase system (LP/SCN<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in mastitis resistance. In: BASSALIK-CHABIELSKA, L.; RYNIOWICZ, Z. (Ed.), **Proceedings of International Conference on Resistant Factors and Genetic Aspects of Mastitis Control**. Jablonna, 1980. p. 421–438.

KORHONEN, H.; KAARTINEN, L. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. (Ed.), **The Bovine Udder and Mastitis**. Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 1995. p.76–82.

KUANG, Y.; TANI, K.; SYNNOTT, A.J.; OHSHIMA, K.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H.; TANJI, Y. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. **Biochemical Engineering Journal**, v.45, p.76–81, 2009.

KUSSENDRAGER, K.D.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Lactoperoxidase: Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.S19-S25, 2000.

LEWIS, M.; HEPPELL, N. **Continuous thermal processing of foods: Pasteurization and UHT sterilization**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 447p.

LITTLE, C.L.; RHOADES, J.R.; SAGOO, S.K.; HARRIS, J.; GREENWOOD, M.; MITHANI, V.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiology**, v.25, p.304–312, 2008.

LOPES, C.R. de A. **Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento**. 2010. 79p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

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

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v.40, p.1197–1211, 2007.

MIN, S.; HARRIS, L.J.; KROCHTA, J.M. Antimicrobial effect of lactoferrin, lysozyme and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enteritica* and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Science**, v.70, p.332-338, 2005.

MONTIEL, R.; BRAVO, D.; ALBA, M. de; GAYA, P.; MEDINA, M. Combined effect of high pressure treatments and the lactoperoxidase system on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p.1-7, 2012, doi:10.1016/j.ifset.2012.03.005.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região Sul do Brasil, Maringá, 2002. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO–NUPEL, 2002. p.206-217.

NATZKE, R.P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1431-1442, 1981.

NDAMBI, O.A; KAMGA, P.B.; IMELÉ, H.; MENDI, S.D.; FONTEH, F.A. Effects of milk preservation using the lactoperoxidase system on processed yogurt and cheese quality. **African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development**, v.8, p.358–374, 2008.

ORAM, J.D.; REITER, B. The Inhibition of *Streptococci* by Lactoperoxidase, Thiocyanate and Hydrogen Peroxide. The oxidation of thiocyanate and the nature of inhibitory compound. **Biochemical Journal**, v.100, n.2, p. 382-388, 1966.

PEREIRA, A.R., MACHADO, P.F., BARANCELLI, G.; SILVA, L.V.F. Contagem de células somáticas e qualidade do leite. **Revista dos Criadores**, v.67, n.807, p.19-21, 1997.

PÉREZ, L.O. Efecto de inhibición del peróxido de hidrógeno sobre la enzima lactoperoxidasa de origen bovino y caprino. **Revista Biología**, v.1, n.2, p.13-23, 1987.

PONCE, P. Thiocyanate content in raw milk under the American tropic conditions in relation to the activation of the lactoperoxidase system. **Revista de Salud Animal**, v.34, n.2, p.115-119, 2012.

RAYBAUDI-MASSILIA, R.M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruits juices by traditional and alternative natural antimicrobials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.8, p.157-180, 2009.

REITER, B.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **Journal of Food Protection**, n.47, p.724-732, 1984.

SAAD, A.H. Activation of milk lactoperoxidase system for controlling pseudomonas in cow's milk. **International Journal of Dairy Science**, v.3, p.131–136, 2008.

SEIFU, E.; BUYS, E.M.; DONKIN, E.F.; PETZER; I.M.. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. **Food Control**, v.15, p.447–452, 2004.

SEIFU, E.; BUYS, E.M.; DONKIN,E.F. Significance of lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. **Food Science and Technology**, v.16, p. 137-157, 2005.

FREITAS, W. R. Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando.

SERMON, J.; VANOIRBEEK, K.; SPIEGELEER, P. de.; VAN HOUTDT, R.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C.W. Unique stress response to the lactoperoxidase-thiocyanate enzyme system in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v.156, n.2, p.225-232, 2005.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, 2005.

SHARMA, V.; RAJ, D. Lactoperoxidase system origin, efficacy and its effect on milk constituent: a review. **Indian Journal Dairy Bioscience**, v.10, p.9-13, 1999.

SHOME, B.R.; MITRA, S. das; BHUVANA, M.; KRITHIGA, N.; VELU, D.; SHOME, R.; ISLOOR, S.; BARBUDDHE, S.B.; RAHMAN, H. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1349–1356, 2011.

SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, n.2, p.135-146, 2002.

USA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). In:\_\_\_\_\_. **Production, Supply and Distribution Online. Dairy**. 2012. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

VILAR, M.J.; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L.; SANJUÁN, M.L.; DIÉGUEZ, F.J.; VARELA, M.; YUS, E. Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality. **Food Science & Technology**, v.23, p.4-12, 2012.

VILELA, D.; LEITE, J.L.B.; RESENDE, J.C. Políticas para o leite no Brasil: passado, presente e futuro. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, Maringá, 2002. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO–NUPEL, 2002. p.1-26.

WOLFSON, L.M.; SUMNER, S.S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **Journal of Food Protection**, v.56, p.887-892, 1993.

FREITAS, W. R. Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando.

## **Capítulo 2**

### **ATIVIDADE DA LACTOPEROXIDASE E TEOR DE TIOCIANATO NO LEITE DE VACAS GIROLANDO**

### **Atividade da lactoperoxidase e teor de tiocianato no leite de vacas Girolando**

Resumo – Objetivou-se com esse trabalho, verificar fatores que influenciam a atividade da lactoperoxidase e os níveis de tiocianato no leite cru resfriado de animais da raça Girolando dos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 HG, bem como verificar a correlação entre esses componentes e o número de células somáticas. Foram coletadas 192 amostras de leite de vacas Girolando para determinação da atividade da lactoperoxidase, teor de tiocianato, contagem de células somáticas e teor de proteínas do soro. O valor médio para a atividade da lactoperoxidase foi 10,86 U/mL ( $\pm 7,08$ ) e teor médio de tiocianato foi de 14,21 mg/L ( $\pm 10,43$ ). O valor médio de escore de células somáticas foi de 14,51 ( $\pm 2,36$ ). Foi realizada análise de variância onde se constatou que as variáveis que influenciaram significativamente na atividade da lactoperoxidase foram escore de células somáticas, grupo genético e período de coleta. As variáveis que influenciaram significativamente no teor de tiocianato foram escore de células somáticas, período de coleta e interação grupo genético – período de coleta. As variáveis que apresentaram influencia significativa para o escore de células somáticas foram o número de dias em lactação e o período de coleta. O leite dos animais 1/2 HG foi o que apresentou maior atividade da lactoperoxidase e maior teor de tiocianato. A atividade enzimática é influenciada pelo escore de células somáticas, grupo genético e período de coleta. O teor de tiocianato é influenciado pelo escore de células somáticas, período de coleta e pela interação grupo genético x período de coleta.

**Termos para indexação:** células somáticas, leite bovino, sistema lactoperoxidase.

### **Lactoperoxidase activity and thiocyanate content in the milk of cows Girolando**

Abstract – The aimed of this study was to identify factors that influence in the lactoperoxidase activity and in the thiocyanate levels in cold raw milk from Girolando cows of the genetic groups 1/2, 3/4 and 7/8 HG, as well as check the correlation between these components and the number of somatic cells. Were collected 192 milk samples for determination of the lactoperoxidase activity, thiocyanate content, somatic cell count and serum protein content. The overall average value for the lactoperoxidase activity was 10.86 U/mL ( $\pm 7.08$ ) and the thiocyanate average content was 14.21 mg/L ( $\pm 10.43$ ). The average values for somatic cell score were 14.51 ( $\pm 2.36$ ). Analysis of variance was performed and showed that the variables that significantly influenced in the lactoperoxidase activity were somatic cell score, genetic group and sampling period. The variables that significantly influenced in the thiocyanate content were somatic cell score, sampling period and interaction between genetic group and sampling period. The variables that had significant influence for somatic cell score were the number of days in lactation and the sampling period. The milk from 1/2 HG cows showed the highest lactoperoxidase activity and the highest thiocyanate levels. Enzyme activity is influenced by somatic cell score, genetic group and sampling period. The concentration of thiocyanate is influenced by somatic cell score, collection period and the interaction between genetic group x sampling period.

**Index terms:** bovine milk, lactoperoxidase system, somatic cells.

## Introdução

Existem no leite mais de 60 tipos diferentes de enzimas. Com isso, muitas pesquisas são realizadas com o intuito de determinar o papel biológico ou fisiológico desses compostos, bem como verificar a sua relevância na qualidade dos alimentos, processamento tecnológico e estabilidade nos produtos (Andrews et al., 1991).

A lactoperoxidase (EC.1.11.1.7) é uma enzima que ocorre naturalmente no leite e em combinação com o íon tiocianato e o peróxido de hidrogênio, formam um sistema conhecido como sistema lactoperoxidase, que por sua vez, gera íons hipotiocianito, que é um composto que apresenta ação antibacteriana no leite (Al-Baarri et al., 2012).

A lactoperoxidase é uma enzima do grupo das oxidases, as quais estão largamente distribuídas nos sistemas biológicos. Embora seu nome aponte claramente ser de origem láctea, esta pode ser sintetizada nas glândulas mamárias, salivares, lacrimais e também pelo epitélio respiratório dos mamíferos (Wolfson & Sumner, 1993; El-Chemaly et al., 2003; Boots & Floris, 2006; Fox & Kelly, 2006).

O principal papel biológico da lactoperoxidase está associado à proteção do próprio leite, da glândula mamária e do trato intestinal dos lactentes contra micro-organismos patogênicos que possam estar presentes no leite (Kussendrager & Van Hooijdonk, 2000; Seifu et al., 2005; Boots & Floris, 2006; Atasever et al., 2013).

Em geral, a atividade das enzimas lácteas pode ser influenciada por inúmeros fatores, incluindo raça, idade do animal, dieta, estado nutricional, número de lactações, estágio de lactação, saúde da glândula mamária e variações sazonais (Calamari et al., 2005).

O sistema lactoperoxidase (SLP) é um mecanismo inespecífico de proteção da glândula mamária e encontra-se presente em todos os mamíferos (Sermon et al., 2005). Este

FREITAS, W. R. Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando.

sistema compreende uma série de reações químicas, sendo indispensável a presença dos três compostos para ativação do sistema.

Neste trabalho foram verificados os fatores que influenciariam na atividade da lactoperoxidase e nos níveis de tiocianato no leite cru resfriado de animais Girolando dos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês - Gir (HG), bem como se verificou a correlação destes componentes com o número de células somáticas.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal Rural de Pernambuco, no Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), laboratório de qualidade do leite, do Departamento de Zootecnia, e no laboratório de Biotecnologia da Central de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG), da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG).

Foram analisadas 192 amostras de leite de 152 vacas Girolando dos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 HG, com idade variando de 29 a 140 meses e que apresentavam entre 14 e 369 dias em lactação. Os animais foram provenientes de duas propriedades particulares que possuem escrituração zootécnica, situadas na mesorregião do sertão alagoano, microrregião de Batalha, no Estado de Alagoas. O clima local é do tipo tropical semiárido, com chuvas de verão. O período chuvoso se inicia em novembro com término em abril. A precipitação média anual é de 431,8 mm (Mascarenhas et al., 2005).

A coleta das amostras de leite ocorreu em dois períodos distintos: período 1 (agosto-setembro/2012) e período 2 (dezembro/2012), nos quais, todas as vacas estavam submetidas às mesmas condições ambientais. Os componentes da alimentação dos animais durante os dois períodos de coleta estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Alimentos utilizados na dieta dos animais

Grupo genético	Período 1	Período 2
1/2 HG	✓ Concentrado a base de milho <sup>1</sup> , soja <sup>2</sup> , uréia e mistura mineral	✓ Concentrado a base de milho <sup>1</sup> , soja <sup>2</sup> , uréia e mistura mineral
	✓ Pasto de capim milhã <sup>3</sup>	✓ Silagem de sorgo <sup>6</sup>
	✓ Resíduo úmido de cervejaria <sup>4</sup>	✓ Palma forrageira <sup>7</sup>
3/4 e 7/8 HG	✓ Concentrado a base de milho <sup>1</sup> , soja <sup>2</sup> , uréia e mistura mineral	✓ Concentrado a base de milho <sup>1</sup> , soja <sup>2</sup> , uréia e mistura mineral
	✓ Pasto de capim pangolão <sup>5</sup>	✓ Silagem de sorgo <sup>6</sup>
	✓ Resíduo úmido de cervejaria <sup>4</sup>	✓ Palma forrageira <sup>7</sup>
		✓ Resíduo úmido de cervejaria <sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Zea mays* L.; <sup>2</sup>*Glycine max*; <sup>3</sup>*Digitaria horizontalis*; <sup>4</sup>Bagaço de malte e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*); <sup>5</sup>*Digitaria pentzii*; <sup>6</sup>*Sorghum bicolor* L. Moench; <sup>7</sup>*Nopalea cochenillifera*, Salm-Dyck.

Em cada coleta foram recolhidas duas amostras de leite de 40 mL de cada animal, sendo a primeira amostra para determinação da atividade da lactoperoxidase e teor de tiocianato e a segunda amostra para CCS e determinação do teor de proteínas do soro, obtido pela diferença entre os teores de proteína total e caseína.

As amostras de leite foram coletadas assepticamente dos quatro quartos mamários no início da ordenha da manhã, imediatamente após o teste da caneca de fundo preto e o *pré-dipping*, realizado com produto a base de iodo. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo, onde se manteve a temperatura em torno de 4°C até o momento das análises.

As amostras coletadas para determinar a concentração da lactoperoxidase e teor de tiocianato não receberam nenhum tipo de substância conservante e o tempo decorrido entre a coleta e o início dos procedimentos analíticos não ultrapassou 24 horas.

As amostras utilizadas para CCS e análises de proteína total e caseína receberam uma pastilha conservante de Bronopol<sup>®</sup> (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) (*D&F Control System Inc., U.S.A.*). Neste caso, o tempo decorrido entre a coleta e o início das análises não ultrapassou 36 horas. A utilização desse conservante é rotineira para todos os laboratórios da Rede brasileira de qualidade do leite, os quais realizam as análises recomendadas pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de acordo com as Instruções Normativas nº 51 e nº 62 (IN-51 e IN-62) (Brasil, 2002, 2011).

No CENLAG foram realizadas as análises de atividade da lactoperoxidase, segundo procedimento descrito por Kumar & Bhatia (1999), e quantificação do tiocianato, de acordo com metodologia sugerida por CAC (1991), ambas realizadas em triplicata.

Para determinação da atividade da lactoperoxidase, as amostras de leite foram diluídas 40 vezes em solução tampão de fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0). A atividade enzimática foi mensurada utilizando o reagente ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolino-6-ácido sulfônico) sal diamônio) (*Sigma-Aldrich Inc., U.S.A.*). Foi adicionada em cubeta de quartzo, 0,1 mL da amostra de leite e 3,0 mL de solução de ABTS (1 mM.L<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0). A reação foi iniciada a partir da adição de 0,1 mL de solução de peróxido de hidrogênio (3,2 mM). A leitura foi realizada imediatamente, a uma absorbância de 412 nm em função do tempo, durante dois minutos com intervalo de 15 segundos para cada leitura, utilizando espectrofotômetro Biochrom<sup>®</sup> Libra S22 UV/Vis (*Biochrom Ltd., United Kingdom*). Para a leitura de cada amostra, o espectrofotômetro foi zerado com o seu respectivo branco, composto por 0,1 mL da amostra de leite e 3,0 mL de solução de ABTS.

Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol de ABTS por minuto em temperatura ambiente (≈20°C). A atividade, expressa em unidade/mL (U/mL) de leite, foi calculada de acordo com Putter & Becker (1983).

Para verificação dos níveis de tiocianato nas amostras, foram utilizados 8 mL de leite mais 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) (20% p/v). Em seguida, a mistura foi levada a centrífuga Sorvall<sup>®</sup> ST16R (*Thermo Fischer Scientific Inc., U.S.A.*), por 10 minutos a 5.000 rpm e temperatura de 4°C; posteriormente, as amostras foram filtradas em papel Watman de porosidade 40, para obtenção do sobrenadante. A reação foi preparada em tubo de ensaio

adicionando-se 2 mL do sobrenadante mais 2 mL de reativo de coloração (160g de nitrato férrico nonahidratado, 500 mL de ácido nítrico (2N) e água deionizada até formar o volume de 1.000 mL). A leitura foi realizada em cubeta de quartzo, até 10 minutos após a preparação da reação, a uma absorvância de 460 nm utilizando espectrofotômetro Biochrom<sup>®</sup> Libra S22 UV/Vis (*Biochrom Ltd., United Kingdom*). O branco foi composto por água deionizada mais o reativo de coloração.

Para realização dos cálculos do teor de tiocianato nas amostras de leite, foi construída uma curva de calibração com 11 pontos (mínimo de 1,25 mg/L e máximo de 25 mg/L), utilizando uma solução padrão contendo tiocianato, preparada com 83,64 mg de tiocianato de potássio, previamente seco em estufa por 6h a 105°C, dissolvido em água deionizada até completar o volume de 1.000 mL.

No PROGENE, realizaram-se as análises de quantificação das células somáticas e teores de proteína total e caseína. Foram obtidas duas contagens na mesma amostra, onde o valor correspondente à média aritmética das duas contagens realizadas representou a amostra.

As análises de CCS foram realizadas no equipamento Somacount 300<sup>®</sup> (*Bentley Instruments Inc., U.S.A.*), que opera segundo o princípio da citometria de fluxo, com os resultados expressos em unidade de células somáticas por mL de leite.

As análises de proteína total e caseína foram realizadas por determinação espectrométrica no infravermelho médio, utilizando o equipamento Bentley 2000<sup>®</sup> (*Bentley Instruments Inc., U.S.A.*), com os resultados expressos em g/100g de leite.

Com relação às análises estatísticas, os dados de CCS foram transformados para escala de escore de células somáticas (ECS), baseado em Shook & Schutz (1994), onde  $ECS = \log_2(CCS/100) + 3$ , por não apresentar distribuição normal.

Com o propósito de verificar a influência do nível de produção de leite das vacas sobre as variáveis respostas, foram formadas quatro classes de nível produtivo, da seguinte forma: 1 (produção de leite > 5 e ≤ 10kg/dia); 2 (> 10 e ≤ 15kg); 3 (> 15 ≤ 20kg) e 4 (> 20kg/dia).

Para averiguação das variáveis que influenciaram a atividade da lactoperoxidase utilizou-se o seguinte modelo:

$$\hat{Y}_{ijklmnop} = \mu + T_i + PS_j + I_k + DEL_l + ECS_m + GG_n + NP_o + PC_p + GG-NP_{no} + GG-PC_{np} + \varepsilon_{ijklmnop}$$

Em que:

$\hat{Y}_{ijklmno}$  = atividade da lactoperoxidase (U/mL);

$\mu$  = constante comum a todas as observações;

$T_i$  = coeficiente de regressão linear do efeito do teor de tiocianato (mg/L);

$PS_j$  = coeficiente de regressão linear do efeito do teor de proteínas do soro (g/100g);

$I_k$  = coeficiente de regressão linear do efeito da idade do animal (meses);

$DEL_l$  = coeficiente de regressão linear do efeito do número de dias em lactação;

$ECS_m$  = coeficiente de regressão linear do efeito do escore de células somáticas;

$GG_n$  =  $n$ -ésimo efeito do grupo genético ( $n = 1/2$  HG,  $3/4$  HG ou  $7/8$  HG);

$NP_o$  =  $o$ -ésimo nível produtivo do animal ( $o = 1, 2, 3$  ou  $4$ );

$PC_p$  =  $p$ -ésimo período de coleta ( $o = 1$ : agosto-setembro/2012;  $2$ : dezembro/2012);

$GG-NP_{no}$  = efeito da interação entre grupo genético e nível produtivo;

$GG-PC_{np}$  = efeito da interação entre grupo genético e período de coleta;

$\varepsilon_{ijklmnop}$  = erro associado à observação com distribuição  $N(0; \sigma^2_\varepsilon)$ .

A análise de variância, a fim de verificar as variáveis que influenciaram os níveis de tiocianato, foi realizada conforme o modelo:

$$\hat{Y}_{ijklmno} = \mu + PS_i + I_j + DEL_k + ECS_l + GG_m + NP_n + PC_o + GG-NP_{mn} + GG-PC_{mo} + \varepsilon_{ijklmno}$$

Em que  $\hat{Y}_{ijklmno}$  = teor de tiocianato (mg/L);

Todas as variáveis já foram citadas no primeiro modelo.

Foi realizada, também, análise de variância para verificar as variáveis que influenciaram o escore de células somáticas, de acordo com o seguinte modelo:

$$\hat{Y}_{ijklm} = \mu + I_i + DEL_j + GG_k + NP_l + PC_m + GG-NP_{kl} + GG-PC_{km} + \varepsilon_{ijklm}$$

Em que  $\hat{Y}_{ijklm}$  = Escore de células somáticas;

Todas as outras variáveis já foram citadas anteriormente.

Foi realizada análise de correlação entre a atividade da lactoperoxidase (U/mL), teores de tiocianato (mg/L), proteínas do soro (g/100g) e ECS.

Os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando-se o PROC MEANS, PROC GLM, PROC REG e PROC CORR (*Statistical Analysis System*, versão 9.3). Para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5%.

## Resultados e Discussão

O valor médio para a atividade da lactoperoxidase foi 10,86 U/mL ( $\pm 7,08$ ), mínimo de 1,25 e máximo 51,17. O teor médio de tiocianato foi de 14,21 mg/L ( $\pm 10,43$ ), mínimo de 2,32 e máximo de 48,89. Os valores médios de ECS e CCS foram 14,51 ( $\pm 2,36$ ) e  $8,04 \times 10^5$  ( $\pm 1,26 \times 10^6$ ), respectivamente.

A atividade média da lactoperoxidase observada neste trabalho foi superior aos resultados encontrados em vacas da raça Holandesa por Asadpour et al. (2008), no Iran (n =

80), Turner et al. (2007), na Nova Zelândia (n = 20) e Calamari et al. (2005), na Itália (n = 252).

Houve uma grande variação individual da atividade da lactoperoxidase, da mesma forma como relatado por Fonteh et al. (2002), Seifu et al. (2007), Lujerdean & Buena (2010) e Yaqub et al. (2012).

Os níveis de tiocianato encontrados também foram superiores aos obtidos por Fweja et al. (2007), em vacas leiteiras Ayrshire (n = 21) e Tanzania Short Horn Zebu (n = 12) na Tanzânia; por Ponce (2012), em animais de raças rústicas em Cuba (n = 106), Venezuela (n = 82) e México (n = 315) e; em vacas Sahiwal (n = 15) por Yaqub et al. (2012), no Paquistão.

Os teores de tiocianato também variaram bastante entre os indivíduos, corroborando com as pesquisas realizadas por Ponce et al. (1998), Fonteh et al. (2002), Seifu et al. (2007) e Yaqub et al. (2012).

O ECS influenciou significativamente ( $P < 0,05$ ) na atividade da lactoperoxidase. A quantidade de células somáticas é importante pelo fato da enzima ser produzida principalmente por leucócitos polimorfonucleares que estão presente no leite (Korhonen, 1980). Portanto, quanto maior a infecção na glândula mamária, maior é o número de células do sistema imune presente no leite e, conseqüentemente, maior atividade desta enzima. Seifu et al. (2007) e Isobe et al. (2011) realizaram pesquisa de lactoperoxidase no leite de vacas holandesas e cabras Saanen, respectivamente, e também verificaram maior atividade enzimática no leite dos animais que apresentaram maior quantidade de células somáticas.

A atividade da lactoperoxidase também foi influenciada significativamente ( $P < 0,01$ ) pelo grupo genético (Tabela 2). Isso indica que houve diferença entre os indivíduos de acordo com a proporção genética de cada uma das raças. Os animais 1/2 HG apresentaram maior atividade enzimática média, diferindo de forma significativa dos outros dois grupos (3/4 e 7/8 HG), conforme Tabela 3. No entanto, ao avaliar o ECS dos três grupos genéticos verificou-se

que o leite das vacas 1/2 HG também apresentou maiores valores de ECS, fazendo com que o maior número de células tenha contribuído para a maior atividade enzimática.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para a atividade da lactoperoxidase

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Tiocianato	1	65,0457 <sup>ns</sup>
Proteínas do soro	1	7,9827 <sup>ns</sup>
Idade animal	1	46,9284 <sup>ns</sup>
Dias em lactação	1	2,7348 <sup>ns</sup>
Escore de células somáticas	1	157,9598*
Grupo genético	2	757,9565**
Nível produtivo	3	18,3435 <sup>ns</sup>
Período de coleta	1	520,4603**
Grupo genético x nível produtivo	6	43,7125 <sup>ns</sup>
Grupo genético x período de coleta	2	10,0944 <sup>ns</sup>

R<sup>2</sup> = 0,3669; GL = Graus de liberdade; \*\* significativo a 1% (P < 0,01); \* significativo a 5% (P < 0,05); <sup>ns</sup> Não significativo.

O período de coleta das amostras também influenciou de forma significativa (P < 0,01) na atividade enzimática. Em geral, o ECS foi maior no 1º período de coleta, para os três grupos genéticos; portanto, a maior atividade enzimática verificada nesse período também deve ser atribuída a esta condição. Calamari et al. (2005) estudaram a atividade da lactoperoxidase no leite de vacas holandesas durante as quatro estações do ano na Itália e verificaram que a atividade não foi alterada significativamente em nenhuma delas.

**Tabela 3.** Valores médios ajustados para atividade da lactoperoxidase (U/mL), teor de tiocianato (mg/L) e ECS por grupo genético e por período de coleta

Fontes de variação	Lactoperoxidase	Tiocianato	ECS	
Grupos genéticos	1/2 HG	15,400 <sup>a</sup>	16,225 <sup>a</sup>	14,989 <sup>a</sup>
	3/4 HG	8,475 <sup>b</sup>	13,475 <sup>a</sup>	14,525 <sup>ab</sup>
	7/8 HG	8,229 <sup>b</sup>	13,069 <sup>a</sup>	14,003 <sup>b</sup>
Períodos de coleta	1*	12,340 <sup>a</sup>	18,320 <sup>a</sup>	14,891 <sup>a</sup>
	2**	8,943 <sup>b</sup>	9,805 <sup>b</sup>	14,063 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, por fonte de variação, diferem a 5% de significância; \*agosto-setembro/2012; \*\*dezembro/2012.

No presente trabalho, alguns ingredientes da dieta dos animais foram diferentes nos dois períodos, porém Fweja et al. (2007) relatam que a atividade da lactoperoxidase não é essencialmente afetada pela dieta dos animais.

Não foi verificada influência significativa ( $P > 0,05$ ) das variáveis tiocianato, proteínas do soro, idade da vaca, dias em lactação e nível produtivo sobre a atividade da lactoperoxidase (Tabela 2).

De acordo com Ponce (2012), a concentração ótima de tiocianato para ativação do sistema lactoperoxidase é de 0,25 mmol/L (14,50 mg/L), e a concentração média para o tiocianato observada na presente pesquisa foi de 14,21 mg/L, ou seja, muito próxima do valor ótimo. Assim, esta variável não influenciou a atividade enzimática.

Não foi encontrado na literatura estudos avaliando a utilização das proteínas do soro afetando a atividade da lactoperoxidase. Esta variável deveria ser relevante pelo motivo da lactoperoxidase ser uma proteína presente no soro do leite, porém essa importância não foi verificada nesta pesquisa.

O resultado da idade da vaca não ter sido uma fonte de variação influente sobre a atividade da lactoperoxidase é contrário aos resultados relatados por Asadpour et al. (2008), trabalhando com animais holandeses de primeira a terceira ordens de parto.

Com relação ao número de dias em lactação, os resultados da presente pesquisa foram contrários aos obtidos por Althaus et al. (2001), Fonteh et al. (2002), Lujerdean & Buena (2010) e Yaqub et al. (2012) ao trabalharem com leite ovino, caprino, bovino e bubalino, respectivamente. Nestes trabalhos foi verificada uma variação cíclica da atividade enzimática, onde a atividade aumentou durante o curso da lactação e depois começou a decair, apesar de terem sido observados picos e depressões durante a lactação. Esses trabalhos acompanharam a atividade enzimática no leite dos mesmos animais durante a lactação, diferente da presente pesquisa, em que a amostragem foi realizada em sua maioria em animais distintos.

O nível produtivo, mesmo não tendo sido de importância neste trabalho, pode vir a alterar a composição do leite, uma vez que o teor de cada um dos componentes do leite não acompanha necessariamente o acréscimo ou o decréscimo no volume de leite produzido. Yaqub et al. (2012) não encontraram associação entre atividade da lactoperoxidase e produção de leite.

Nenhuma das interações, grupo genético x nível produtivo e grupo genético x período de coleta, apresentaram influência significativa ( $P > 0,05$ ) na atividade da lactoperoxidase (Tabela 2).

Assim como a lactoperoxidase, os níveis de tiocianato também sofreram influência significativa ( $P < 0,05$ ) do ECS (Tabela 4). Segundo Ponce (2012), quanto maior o índice de mastite no rebanho, maiores serão os níveis de tiocianato. Isso deve estar relacionado com o aumento da permeabilidade do tecido mamário e com isso, uma maior intensidade no fluxo de íons por diferença de pressão osmótica entre o sangue e o leite. Pode haver também algum mecanismo de transporte ativo, como com outros íons de características semelhantes, estimulado pelas alterações na permeabilidade do epitélio da glândula mamária (Ponce & Bell, 1986; Vilotte, 2002).

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância para o teor de tiocianato

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Proteínas do soro	1	289,1290 <sup>ns</sup>
Idade animal	1	258,8902 <sup>ns</sup>
Dias em lactação	1	79,5690 <sup>ns</sup>
Escore de células somáticas	1	380,8800*
Grupo genético	2	136,3677 <sup>ns</sup>
Nível produtivo	3	7,0114 <sup>ns</sup>
Período de coleta	1	2463,4927**
Grupo genético – nível produtivo	6	101,5625 <sup>ns</sup>
Grupo genético – período de coleta	2	328,4142*

$R^2 = 0,3355$ ; GL = Graus de liberdade; \*\* significativo a 1% ( $P < 0,01$ ); \* significativo a 5% ( $P < 0,05$ ); <sup>ns</sup> Não significativo.

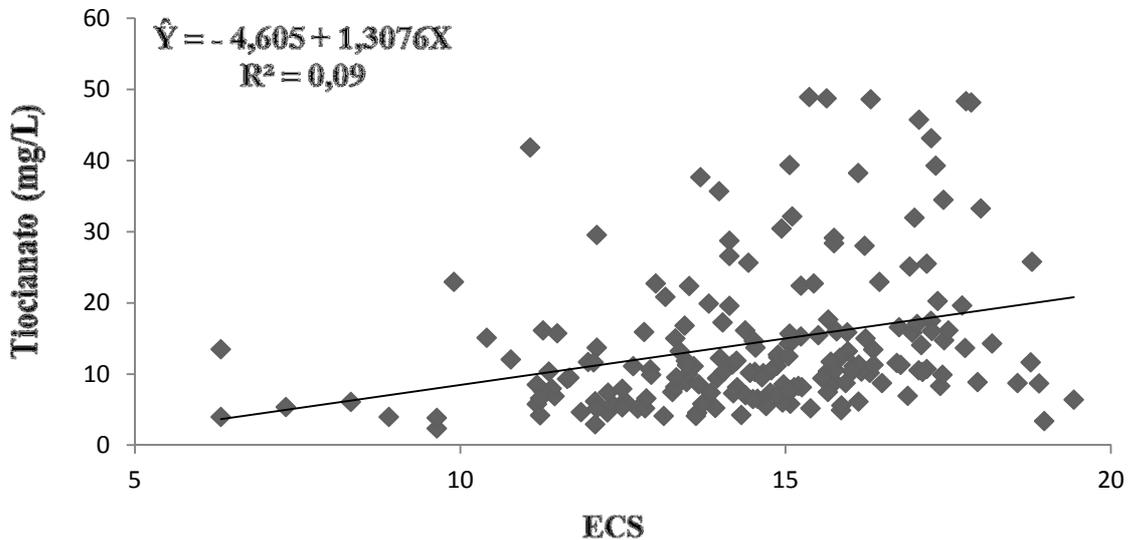
O período de coleta influenciou significativamente ( $P < 0,01$ ) o teor de tiocianato no leite de vacas girolando. Os valores médios ajustados para a concentração de tiocianato por grupo genético e período de coleta podem ser observados na tabela 3. De forma semelhante à atividade da lactoperoxidase, o 1º período de coleta foi o que apresentou maior concentração de tiocianato, que deve estar relacionado à maior quantidade de células somáticas observada no período em questão. No caso do leite de vacas saudáveis, os altos níveis de tiocianato se devem a dieta dos animais, mais precisamente relacionados com os alimentos que apresentam glicosídeos cianogênicos em sua composição, que são os precursores deste íon (Korhonen, 2004).

Os valores crescentes de ECS influenciaram na elevação da concentração de tiocianato (Figura 1).

Teoricamente, esperava-se que o segundo período de coleta fosse chuvoso, de acordo com os relatos de Mascarenhas et al. (2005), porém 2012 foi um ano atípico e, entre o 1º e o 2º período de coletas, o registro de precipitação pluviométrica na região foi igual a zero, fazendo com que a segunda coleta tenha sido realizada numa época mais seca que a primeira. No entanto, a oferta de alimentos e água para as vacas foi constante durante toda a pesquisa. Como houve diferenciação nos ingredientes utilizados para compor a dieta das vacas entre cada período de coleta, uma parte da diferença apresentada nos teores de tiocianato pode ser atribuída à alimentação utilizada nas duas épocas, principalmente com relação ao pasto utilizado no 1º período, capim pangolão e capim milhã, que foram substituídos por silagem de sorgo e palma forrageira durante a 2ª época de coleta.

Os níveis de tiocianato foram bem maiores no 1º período de coleta da pesquisa, justamente na época em que o pasto fazia parte da dieta dos animais. Calamari et al. (2005) ao avaliarem os níveis de tiocianato no leite de vacas holandesas em diferentes estações do ano, na Itália, verificaram variações significativas entre as estações, sendo os níveis deste íon

menores durante o verão e maiores durante o inverno, embora a alimentação tenha sido a mesma durante todo o período, com pequenas variações na quantidade de cada ingrediente.



**Figura 1.** Comportamento observado e predito para o tiocianato (mg/L) em função do ECS

A interação grupo genético x período de coleta demonstrou haver diferença ( $P < 0,05$ ) na quantidade de íons tiocianato no leite entre os grupos genéticos nos distintos períodos de coleta.

Foi observado que os animais do grupo 1/2 HG no 1º período foram os que apresentaram os maiores valores médios de tiocianato em todo o trabalho, (Tabela 5), reforçando a hipótese de influência das células somáticas sobre o sistema lactoperoxidase, mesmo que a alimentação tenha sido responsável por parte da concentração deste íon.

Nesta pesquisa, as proteínas do soro, a idade animal, o número de dias em lactação, o grupo genético, o nível produtivo e as interações não apresentaram influência ( $P > 0,05$ ) sobre os níveis do tiocianato.

Mesmo não havendo significância da idade, houve tendência de aumento dos teores do tiocianato em animais mais velhos, o que parece estar associado a mecanismos de resistência natural da glândula mamária, através da atividade de defesa não específica do sistema

lactoperoxidase (Ponce et al., 1998). Estes mesmos autores verificaram menores valores de tiocianato durante ao primeiro parto e concentrações três vezes maior nas lactações seguintes.

Fonteh et al. (2002) não observaram diferenças significativas nos níveis de tiocianato ao longo da lactação de cabras, porém essa variável apresentou-se significativa no leite de vacas holandesas. Ponce et al. (1998) e Yaqub et al. (2012) constataram diferenças significativas nos níveis de tiocianato no leite de vacas holandesas e sahiwal, respectivamente, de acordo com o estágio de lactação.

**Tabela 5.** Valores médios ajustados para o tiocianato (mg/L) por grupo genético e período de coleta

Fontes de variação		Grupos genéticos (HG)		
		1/2	3/4	7/8
Períodos de coleta	1*	22,835 <sup>aA</sup>	15,501 <sup>bA</sup>	16,138 <sup>bA</sup>
	2**	9,615 <sup>aB</sup>	11,450 <sup>aA</sup>	10,000 <sup>aB</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha e médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem a 5% de significância; \*agosto-setembro/2012; \*\*dezembro/2012.

Não foram encontrados na literatura relatos entre grupos genéticos e níveis de tiocianato no leite. Ainda assim, Ponce (2012), ao analisar o conteúdo de tiocianato no leite de três raças de vacas leiteiras rústicas em países tropicais (Cuba, Venezuela e México) verificou não haver influência significativa da raça sobre os teores desse íon. Como o Girolando é uma raça considerada rústica, os resultados deste autor podem ter alguma relação com o presente trabalho.

Com relação ao nível produtivo dos animais, Yaqub et al. (2012) também não encontraram associação entre os teores de tiocianato e produção de leite.

A ECS foi influenciada significativamente ( $P < 0,01$ ) pelo número de dias em lactação dos animais e pelo período de coleta das amostras (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resumo da análise de variância para o escore de células somáticas

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Idade animal	1	9,5316 <sup>ns</sup>
Dias em lactação	1	69,4922**
Grupo genético	2	12,6886 <sup>ns</sup>
Nível produtivo	3	2,6707 <sup>ns</sup>
Período de coleta	1	39,4800**
Grupo genético x nível produtivo	6	5,9152 <sup>ns</sup>
Grupo genético x período de coleta	2	4,2216 <sup>ns</sup>

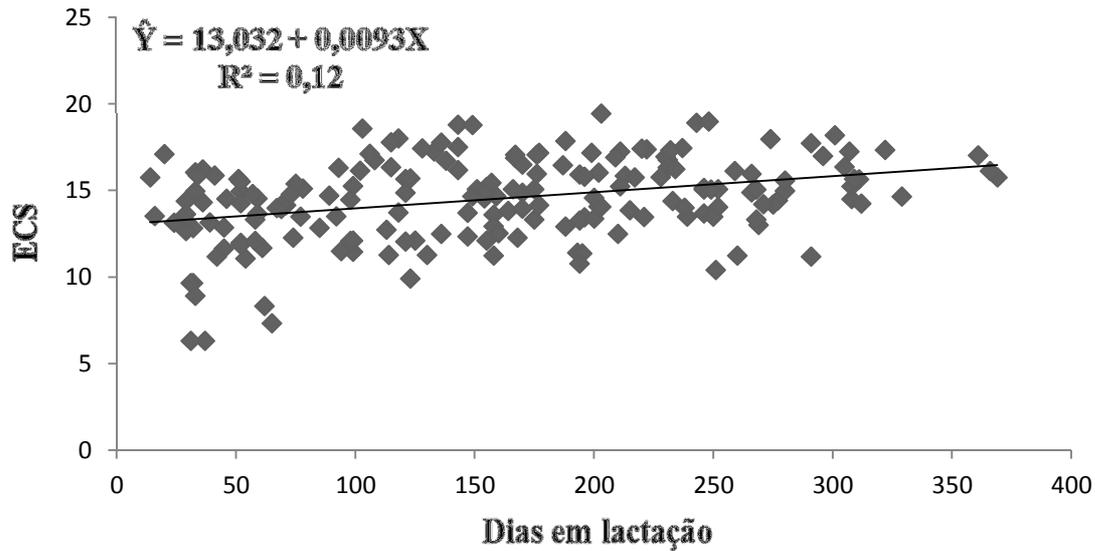
R<sup>2</sup> = 0,2548; GL = Graus de liberdade; \*\* significativo a 1% (P < 0,01); <sup>ns</sup> Não significativo.

É natural que animais com lactação mais avançada apresentem maior número de células somáticas por mL de leite, uma vez que, devido à redução no volume de leite produzido ocorre uma concentração da maioria dos seus compostos.

O aumento no número de dias em lactação influenciou significativamente (P < 0,05) na elevação do ECS (Figura 2). Nas análises de regressão realizadas neste trabalho, os valores de R<sup>2</sup> foram baixos, entretanto estes valores representam o percentual da variância que pode ser explicado entre as variáveis utilizadas na regressão, não tendo sido encontrados resultados na literatura que pudessem ser confrontados.

No caso do período de coleta, as diferenças médias em relação ao ECS nos dois períodos podem ser observadas na tabela 3. Como a segunda coleta foi realizada numa época mais seca que a primeira, esse fato deve ter influenciado na quantidade de células somáticas, fazendo com que os níveis de mastite fossem diminuídos nesse período. Na época seca, os riscos de se contrair mastite ambiental diminuem justamente pelo fato do ambiente em que vivem os animais, encontrar-se mais seco. Calamari et al. (2005), na Itália, também verificaram expressiva redução na contagem de células somáticas no leite durante o verão.

As variáveis idade da vaca, grupo genético, nível produtivo e interações grupo genético - nível produtivo e grupo genético - período de coleta não apresentaram diferença significativa no ECS, mostrando não influenciar nesta característica para o rebanho estudado.



**Figura 2.** Comportamento observado e predito para ECS em função do número de dias em lactação.

A partir da análise de correlação constatou-se associações positivas e significativas ( $P < 0,05$ ) entre tiocianato e ECS ( $r = 0,30$ ), tiocianato e proteínas do soro ( $r = 0,25$ ) e ECS e proteínas do soro ( $r = 0,20$ ), sugerindo que o aumento de uma característica irá proporcionar o aumento da outra.

A lactoperoxidase não apresentou correlação significativa ( $P > 0,05$ ) com nenhuma das variáveis estudadas, corroborando com os resultados obtidos por Fonteh et al. (2002) e Fweja et al. (2007), que não observaram correlação significativa entre a lactoperoxidase e o tiocianato em seus trabalhos. Asadpour et al. (2008) não observaram correlação entre lactoperoxidase e o número de células somáticas no leite. Apenas Seifu et al. (2007), trabalhando com leite caprino, verificaram alta correlação significativa entre lactoperoxidase e células somáticas, mas também não observaram significância entre lactoperoxidase e tiocianato e entre CCS e tiocianato.

Ao avaliar a correlação, por grupo genético, considerando o ECS e a lactoperoxidase, embora os resultados não tenham sido significativos, os grupos genéticos 1/2 e 7/8 HG

FREITAS, W. R. Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando.

apresentaram uma associação negativa entre as duas variáveis, em que o aumento da lactoperoxidase induz a uma redução no ECS.

### **Conclusões**

O leite dos animais 1/2 HG apresentaram maior atividade da lactoperoxidase e maior teor de tiocianato.

A atividade da lactoperoxidase é influenciada pelo escore de células somáticas, grupo genético e período de coleta.

O teor de tiocianato é influenciado pelo escore de células somáticas, período de coleta e pela interação grupo genético x período de coleta.

### **Agradecimentos**

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

Ao proprietário da fazenda pela concessão dos animais para realização desta pesquisa.

### **Referências**

AL-BAARRI, A.N.; OGAWA, M.; VISALSOK, T.; HAYAKAWA, S. Lactoperoxidase immobilized onto various beads for producing natural preservatives solution. **Journal of Applied Food Technology**, v.1, n.1, p.4-6, 2012.

ALTHAUS, R.L.; MOLINA, M.P.; RODRÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ, N. Analysis time and lactation stage influence on lactoperoxidase system components in dairy ewe milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.8, p.1829–1835, 2001.

ANDREWS, A.T.; OLIVECRONA, T.; BEGTSSON-OLIVECRONA, G.; FOX, P.F.; BJÖRCK, L.; FARKYE, N.Y. Indigenous enzymes in milk. In: Fox P.F. (Ed.) **Food Enzymology**. London: Ed. Elsevier, 1991. p.53-129.

ASADPOUR, R.; TAYEFI-NASRABADI, H.; MOGHADAM, G.A.; NOFOUZI, K. Correlation between lactoperoxidase activity and somatic cell count for diagnosis subclinical mastitis in early lactation of dairy cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.7, n.7, p.777-779, 2008.

ATASEVER, A.; OZDEMIR, H.; GULCIN, I.; KUFREVIOGLU, O.I. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. **Food Chemistry**, v.136, p.864–870, 2013.

BOOTS, J.W., FLORIS, R. Lactoperoxidase: from catalytic mechanism to practical applications. **International Dairy Journal**, v.16, p.1272–1276, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 2002, seção 1, p.13-22.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 dez. 2011, seção 1, p.6-11.

CAC. Codex Alimentarius. **Guidelines for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system**, CAC/GL 13-1991, 1991. 5p.

CALAMARI, L.; MAIANTI, M.G.; BANI, P.; SARTI, L. Seasonal variations of some enzyme activities of cow milk. **Italian Journal of Animal Science**, v.4, p.212-214, 2005.

EL-CHEMALY, S.; SALATHE, M.; BAIER, S.; CONNER, G.E.; FORTEZA, R. Hydrogen peroxide – scavenging properties of normal human airway secretions. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.167, p.425-430, 2003.

FONTEH, F. A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows and goats milk throughout lactation. **Journal of Dairy Research**, n. 69, p.401-409, 2002.

FOX, P.F.; KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - Part 1. **International Dairy Journal**, v.16, p.500-516, 2006.

FWEJA, L.W.; LEWIS, M.J.; GRANDISON, A.S. Alternative strategies for activation of the natural lactoperoxidase system in cows' milk: trials in Tanzania. **Journal of Dairy Research**, v.74, n.4, p.381-386, 2007.

FREITAS, W. R. Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando.

ISOBE, N.; KUBOTA, H.; YAMASAKI, A.; YOSHIMURA, Y. Lactoperoxidase activity in milk is correlated with somatic cell count in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.8, p.3868–3874, 2011.

KORHONEN, H. The lactoperoxidase system in mastitic milk. FAO LP Expert Meeting 29 February–1 March 2004, Cape Town South Africa, 2004.

KORHONEN, H. Potential role of the lactoperoxidase system (LP/SCN<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in mastitis resistance. In: BASSALIK-CHABIELSKA, L.; RYNIOWICZ, Z. (Ed.), **Proceedings of International Conference on Resistant Factors and Genetic Aspects of Mastitis Control**. Jablonna, 1980. p. 421–438.

KUMAR, R.; BHATIA, K.L. Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk. **Lait**, v.79, n.2, p. 269-274, 1999.

KUSSENDRAGER, K.D.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Lactoperoxidase: Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.S19-S25, 2000.

LUJERDEAN, A.; BUNEA, A. The Influence of Lactation Stage on Lactoperoxidase Activity. **Animal Science and Biotechnologies**, v.67, n.1-2, p.231-234, 2010.

MASCARENHAS, J.C.; BELTRÃO, B.A.; SOUZA JUNIOR, L.C. 2005. Diagnóstico do Município de Major Izidoro. Projeto Cadastro de Fontes de Abastecimento por Água subterrânea, Estado de Alagoas. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005. 15p.

PONCE, P.; ALFONSO, H.A.; DÍAZ, B.; CAPDEVILA, J.; YÁNEZ, J. Factores asociados al contenido de tiocianato en leche cruda. **Revista de Salud Animal**, v.76, p.96-99, 1998.

PONCE, P.; BELL, L. Estudio de la lactancia en vacas de la raza Holstein, Cebú y sus cruces en Cuba. **Revista de Salud Animal**, v.8, p.73-88, 1986.

PONCE, P. Thiocyanate content in raw milk under the American tropic conditions in relation to the activation of the lactoperoxidase system. **Revista de Salud Animal**, v.34, n.2, p.115-119, 2012.

PUTTER J., BECKER R., Peroxidases, in: Bergmeyer H. U. (Ed.), **Methods of enzymatic analysis**, Weinheim: Verlag Chemie, 1983. p. 286-293.

SEIFU, E.; DONKIN, E.F.; BUY, E.M. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats. **Small Ruminant Research**, v.69, p.154–158, 2007.

SEIFU, E.; BUYS, E.M.; DONKIN, E.F. Significance of lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. **Food Science and Technology**, v.16, p. 137-157, 2005.

SERMON, J.; VANOIRBEEK, K.; SPIEGELEER, P. de.; VAN HOUDT, R.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C.W. Unique stress response to the lactoperoxidase-thiocyanate enzyme system in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v.156, n.2, p.225-232, 2005.

SHOOK, G.E.; SCHUTZ, M.M. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. **Journal Dairy of Science**, v.77, p.648-658, 1994.

TURNER, S.A.; THOMSON, N.A.; AULDIST, M.J. Variation of lactoferrin and lactoperoxidase in bovine milk and the impact of level of pasture intake, **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.50, n.1, p.33-40, 2007.

VILOTTE, J.L. Lowering the milk lactose contents in vivo: potential interests, strategies and physiological consequences. **Reproduction Nutrition Development.**, v.42, p.127-132, 2002.

WOLFSON, L.M.; SUMNER, S.S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **Journal of Food Protection.**, v.56, p.887-892, 1993.

YAQUB, T.; SADAF, S.; MUKHTAR, N.; ZANEB, H.; SHABBIR, M.Z.; AHMAD, A.; ASLAM, A.; ASHRAF, K.; AHMAD, N.; REHMAN, H. The influence of time elapsed after milking and lactation stage on the lactoperoxidase system of milk in Sahiwal cattle and Nili-Ravi buffaloes. **International Journal of Dairy Technology**, v.65, n.3, p.360-364, 2012.