

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

GABRIELA THAÍS KLAHR

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS CONTRA AS PRINCIPAIS BACTÉRIAS
ENVOLVIDAS NA MASTITE BOVINA**

**Dom Pedrito
2016**

GABRIELA THAÍS KLAHR

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS CONTRA AS PRINCIPAIS BACTÉRIAS
ENVOLVIDAS NA MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Zootecnia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Zootecnia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciane
Segabinazzi

Coorientadora: Me. Ciências Biol. Cíntia
Saydelles da Rosa

**Dom Pedrito
2016**

K63a KLAHR, GABRIELA THAÍS
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO E IN VIVO DO EXTRATO
ETANÓICO DE PRÓPOLIS CONTRA AS PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENVOLVIDAS
NA MASTITE / GABRIELA THAÍS KLAHR.
51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade
Federal do Pampa, ZOOTECNIA, 2016.

"Orientação: LUCIANE RUMPEL SEGABINAZZI".

1. BOVINOS LEITEIROS. 2. MICRO-ORGANISMOS. 3. PRÓPOLIS. 4.
QUALIDADE DO LEITE. I. Título.

GABRIELA THAÍS KLAHR

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO ETANÓLICO
DE PRÓPOLIS CONTRA AS PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA
MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Zootecnia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Zootecnia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 27/06/2016

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Luciane Segabinazzi

Orientadora

Campus Dom Pedrito – UNIPAMPA

Me. Ciências Biol. Cíntia Saydelles da Rosa

Campus Dom Pedrito – UNIPAMPA

Dra. Anelise Afonso Martins

Campus Dom Pedrito – UNIPAMPA

Dedico este trabalho a meus queridos avós Iria Rosa Klahr, Clara Anna e Hugo Beuren *in memoriam*. A simplicidade com que viveram e a forma honesta e singela de lidar com o próximo, são os legados que sempre levarei comigo.

“A cada partida, mesmo com o sabor amargo da despedida, fica a certeza do momento doce do reencontro. ”

AGRADECIMENTO

A meus pais, Anisia e Nelson, pessoas incríveis e batalhadoras, que me ensinaram a sempre acreditar e seguir em frente e que para quem trabalha nada é difícil ou impossível. Agradeço ao apoio e a toda confiança que sempre depositaram em mim.

Aos meus irmãos. Não citarei nomes nem os porquês da importância de cada um nesta minha caminhada para não me alongar. Somos um batalhão, um time que joga sem frescura nem rodeio e que sabemos que podemos contar uns com os outros para o que der e vier. Obrigada pela amizade e companheirismo sincero.

Aos meus sobrinhos. Apesar de pequenos, sempre entenderam a necessidade desta tia desgarrada em estudar fora. Obrigada por deixarem minhas visitas rápidas e férias escassas mais coloridas e envoltas em um mundo paralelo.

Aos meus amigos, familiares e a todos que direta ou indiretamente, me acompanharam nesta caminhada. Agradecer aos amigos pelos muitos momentos inesquecíveis e de grande aprendizado que vivi nestes 4 anos e meio em Domba City. Em especial, agradecer à Dici, José e Moni por todo o auxílio nas coletas e análises. Obrigada por deixarem as horas de trabalho no laboratório menos maçantes e muito divertidas.

À professora Luciane por aceitar o convite de orientação.

À Cíntia por ser a melhor e mais dedicada coorientadora que um aluno pode sonhar em ter. Agradeço todo incentivo e ajuda nos infindáveis testes.

À Anelise pela dedicação e auxílio no experimento. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência e torcida para que tudo desse certo.

A todos os professores do curso.

Ao produtor Vagner Bolson por abrir a porteira para a universidade e ao Marcelo pelo auxílio durante o período de experimento.

À EMATER do município pelo apoio e deslocamento a propriedade.

Aos colegas do Grupo PET Agronegócio e NESP leite.

Aos colegas do curso, a direção do Campus, ao grupo de funcionários técnicos e terceirizados.

A todos, meu muito obrigado.

"Com todas as suas
imperfeições, a ciência moderna
é uma técnica que guarda com a
natureza uma concordância
suficiente para funcionar."

Steven Weinberg

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis (EEP), *in vitro* e *in vivo*. Para as análises *in vitro*, foi testada a ação do EEP contra os principais agentes bacterianos causadores de mastite e para isso seguiu-se a metodologia de Difusão em Ágar e microdiluição em placas. No experimento *in vivo*, o EEP a 30% (p/v), foi utilizado como sanitizante no manejo de pré e pós-*dipping* em bovinos leiteiros, comparado ao manejo com solução iodada na concentração de 0,2%, pelo período de 35 dias. Através dos resultados encontrados no teste de concentração inibitória mínima (CIM), é possível afirmar que o EEP possui atividade inibitória em 100% das bactérias testadas, na concentração de 10% (p/v). As principais bactérias isoladas da superfície dos tetos e do leite dos animais foram: *Staphylococcus* spp. *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. A contagem padrão em placas de aeróbios mesófilos /mL (CPP/mL) e a contagem de células somáticas/mL (CCS/mL) do grupo experimental com iodo não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre o período inicial e final do tratamento, enquanto que os animais do grupo experimental da própolis apresentaram efeito significativo ($P<0,05$) sobre a CCS/mL inicial comparada a final (176.000 e 98.000, respectivamente). Diante destes resultados, conclui-se que o EEP na concentração de 10% (p/v), pode vir a ser utilizado como desinfetante alternativo para o manejo de pré e pós-imersão dos tetos de bovinos, visto que apresentou melhoria na qualidade microbiológica do leite, além de possuir ação antimicrobiana contra as principais bactérias que causam mastite, sendo benéfica à prevenção desta enfermidade.

Palavras-chave: bovinos leiteiros, micro-organismos, própolis, qualidade do leite

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of ethanol extract of propolis (EEP), in vitro and in vivo. For in vitro analysis, we tested the action of EEP against the main bacterial agents causing mastitis and this was followed by the diffusion methodology Agar and microdilution plates. In the in vivo test, the EEP 30% (w/v) was used as a sanitizer in handling before and after dipping in dairy cattle compared to the handling with iodine solution at 0.2% concentration, at 35 days. From the results found in the minimum inhibitory concentration test (MIC), you can say that the EEP has inhibitory activity in 100% of tested bacteria at a concentration of 10% (w/v). The main bacteria isolated from the surface of ceilings and animal milk were *Staphylococcus* spp. *Corynebacterium* spp. and *Streptococcus* spp. The standard plate count of aerobic mesophilic/mL (SPC/mL) and the somatic cell count/ml (SCC/mL) in the experimental group with iodine showed no significant differences ($P > 0.05$) between baseline and end of treatment, while animals in the experimental group of propolis significant effect ($P < 0.05$) on the SCC/ml compared to the initial end (176,000 and 98,000, respectively). Given these results, it is concluded that the EEP at a concentration of 10% (w/v), could be used as an alternative disinfectant for managing before and after dipping of cattle ceilings, as shown improvement in microbiological quality milk, in addition to having antimicrobial activity against major mastitis-causing bacteria, and beneficial to the prevention of this disease.

Keywords: dairy cattle, microorganisms, milk quality, propolis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Aplicação do <i>California Mastitis Test</i> no rebanho.....	25
Figura 2 - Ilustrações dos testes realizados para identificação bacteriana.....	29
Figura 3 - Ilustrações da técnica de Gram.....	30
Figura 4 - Esquema utilizado para determinar a concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição.....	32
Figura 5 - Leitura da concentração inibitória mínima do extrato em placas de microdiluição.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem das unidades formadoras de colônias de bactérias que causam mastite, em função da ação do extrato etanólico de própolis a 30%, álcool 67°GL e iodo a 0,2%.....	33
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima do extrato etanólico de própolis em diferentes concentrações.....	35
Tabela 3 - Frequência dos micro-organismos isolados do leite bovino.....	37
Tabela 4 - Frequência dos patógenos bacterianos isolados da superfície da pele dos tetos.....	39
Tabela 5 - Valores médios das contagens de células somáticas e contagem de aeróbios mesófilos no leite.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – Antes de Cristo

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CCS – Contagem de Células Somáticas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMT – *California Mastitis Test*

CPP – Contagem Padrão em Placa

DTAA – Divisão de Doenças de Transmissão Alimentar e por Água

EEP – Extrato Etanólico de Própolis

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN-62 – Instrução Normativa nº 62

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL – Mililitro

p/v – Peso/volume

PCA – Ágar Padrão para Contagem

TTC – Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio

UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônia/mililitro

USDA – *United States Department of Agriculture*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Leite.....	18
2.2	Micro-organismos no leite.....	19
2.3	Mastite.....	20
2.3.1	Micro-organismos causadores de mastite.....	20
2.3.2	Tipos de Mastite – conforme a sintomatologia.....	21
2.3.2.1	Mastite Clínica.....	21
2.3.2.2	Mastite Subclínica.....	21
2.3.3	Tipos de Mastite – conforme a forma de contaminação.....	21
2.3.3.1	Contagiosa.....	21
2.3.3.2	Ambiental.....	22
2.4	Própolis.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Local do Experimento.....	24
3.2	Animais.....	24
3.3	Preparo do Extrato Etanólico de Própolis.....	26
3.4	Micro-organismos.....	26
3.5	Preparo dos inócuos bacterianos para testes <i>in vitro</i>	27
3.6	Coletas.....	27
3.6.1	Superfície dos tetos.....	27
3.6.2	Leite.....	27
3.7	Testes.....	28
3.7.1	Contagem de células somáticas.....	28

3.7.2	Contagem padrão em placas de micro-organismos.....	28
3.7.3	Isolamento bacteriano.....	28
3.7.4	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis a 30%, iodo a 0,2% e álcool 67°GL.....	31
3.7.5	Concentração inibitória mínima.....	32
3.8	Análises estatísticas.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O leite *vacum*, sem outra especificação, é o produto oriundo da ordenha completa e continua, em condições de higiene de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. Assim como o leite bovino, o leite proveniente de outros animais deve denominar-se segundo a espécie que provenha (BRASIL, 2011).

Segundo dados do *United States Department of Agriculture – USDA* (2014), o Brasil no ano de 2014, se destacou na 2ª posição mundial em relação ao número de vacas ordenhadas, perdendo apenas para a Índia. No quesito produção de leite, no mesmo ano de 2014, o Brasil ocupou a 5ª posição mundial com produção de 37,17 bilhões de litros, indicando um aumento de 2,7% em relação a 2013.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2014), em 2014 foram ordenhadas no país, 23.064.495 vacas. As regiões que tiveram maior produção de leite em 2014 foram a Região Sul com 12,20 bilhões de litros, seguida pelas regiões Sudeste com 12,16 bilhões de litros, Centro-Oeste com 4,96 bilhões de litros, Nordeste com 3,88 bilhões de litros e Norte com 1,94 bilhão de litros produzidos.

Em âmbito nacional, os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná destacam-se como os principais produtores de leite cru (IBGE, 2014).

Em relação à produtividade dos animais por ano, o país apresentou crescimento de 2,2% ao ano anterior, correspondendo a 1.525 litros/vaca/ano. O Estado do Rio Grande do Sul apresentou as maiores produtividades, com 3.034 litros/vaca/ano (IBGE, 2014).

Segundo Pelczar Jr. *et al.* (1997), o leite pode ser descrito como o alimento humano mais próximo da perfeição. Por ser um alimento altamente perecível, devido a sua temperatura elevada logo após ser ordenhado (37°C), ser rico em nutrientes e possuir pH próximo de 6,6 a 6,8, o leite é considerado um meio bastante favorável ao crescimento bacteriano (KLOSS *et al.*, 2010).

O leite proveniente de animais saudáveis remete a baixa contagem bacteriana, ausência de micro-organismos patogênicos e baixa contagem de células somáticas. A contaminação do leite pode ser dada através de micro-organismos presentes no interior da glândula mamária, da superfície das tetas e do úbere e por meio de utensílios utilizados no manejo da ordenha e na conservação do leite. Além de

prejudicar a qualidade do leite e não receber bonificações, a contaminação bacteriana interfere na industrialização, baixando o tempo de prateleira do leite fluido e de seus derivados e quanto à presença de micro-organismos patogênicos, pode comprometer a segurança alimentar do consumidor (BRITO, *et al.*, 2000; BRITO e BRITO, 2001; LANGONI, 2013). Os cuidados com a higiene da superfície das tetas auxiliam na prevenção de infecções intramamárias das vacas em lactação e melhora a qualidade do leite (CASTRO, 2007).

A mastite, popularmente conhecida por mamite, consiste de um processo inflamatório da glândula mamária, podendo ser causada por micro-organismo (bactérias, fungos, algas e vírus), traumas físicos e agentes químicos irritantes, causando mudanças físico-químicas na composição do leite e no aumento de células somáticas. Além de prejudicar o tecido glandular mamário, pode ocasionar a destruição irreversível de células secretoras de leite (TRONCO, 2003 e LANGONI, 2000).

Muitos micro-organismos responsáveis por causar mastite em bovinos são também patogênicos aos humanos e desta maneira, a doença, assim como os processos de pasteurização devem ser acompanhados com atenção, tendo em vista a importância à saúde pública (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

De acordo com Santos e Fonseca (2007), a resposta inflamatória desencadeada durante a doença, tem como objetivo eliminar o agente patogênico, neutralizar toxinas e regenerar os tecidos prejudicados.

Conforme Langoni *et al.* (2011), existe relação direta entre o número de bactérias presentes nos tetos e a taxa de infecção intramamária e assim, consecutivamente, aumento da contagem de células somáticas/mL (CCS/mL) em bovinos de leite. Segundo Brito *et al.* (2000), a alta contaminação na superfície dos tetos além de ser uma das principais fontes de contaminação microbiana do leite cru, quando entra em contato com a parte interna da glândula mamária, desencadeia um processo infeccioso, conhecido como mastite.

O termo *dipping* deriva da língua inglesa e significa imergir, mergulhar ou afundar. A função do pré-*dipping* é de desinfetar a pele do teto antes da ordenha, reduzindo o número de bactérias presentes na sua superfície e deste modo, diminuir o risco de contaminação do leite e reduzir a disseminação de microrganismos e conseqüentemente a ocorrência de novas infecções (CARVALHO *et al.*, 2012). Além do foco principal que é a descontaminação da pele do teto, a prática do pré-*dipping*

melhora a estimulação da descida do leite, que é um reflexo neuro-hormonal que aumenta a velocidade de ordenha e a extração do leite (SANTOS, 2010). O objetivo do pós-*dipping* é de remover a película de leite que fica após a ordenha no teto e que poderá fornecer ambiente favorável para o desenvolvimento de bactérias, e estas, posteriormente, penetrar no teto e causar infecções (CARVALHO *et al.*, 2012).

Em pesquisa avaliando a ação do extrato etanólico de própolis (EEP), Júnior *et al.* (2012), avaliou que a própolis vermelha apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* frente a diversas bactérias, e entre elas, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Klebsiella* sp., sendo estas, bactérias envolvidas em casos de mastite em rebanhos leiteiros.

Segundo Park *et al.* (2000), as propriedades biológicas da própolis são atribuídas à sua composição, pois esta é constituída de diversos compostos fenólicos presentes no reino vegetal e que são coletados através da resina de plantas. A própolis possui inúmeras propriedades biológicas atribuídas a ela, como ação antimicrobiana, antifúngica, cicatrizante, antiviral, antioxidante, imunestimulador, antitumoral, anti-inflamatória, dentre outras (LUSTOSA *et al.*, 2008; REZENDE *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2002).

Devido a sua variedade de compostos, a própolis vem sendo estudada e aplicada em animais a fim de relacionar sua resposta frente a diferentes desafios de ordem biológica e que reflitam em índices zootécnicos (COELHO *et al.*, 2010).

A Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011 – IN 62 (BRASIL, 2011), trata de diversos temas e entre eles, os requisitos microbiológicos do leite, que envolvem Contagem Padrão em Placa de micro-organismos (CPP) e CCS, que preconiza máximo de 300.000 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro de leite) de CPP e 500.000 CCS/mL (células somáticas por mililitro de leite). A adequação das propriedades a fim de alcançar estes índices é um desafio, e entre tantos fatores que podem comprometer a sanidade do úbere, e assim consecutivamente a qualidade microbiológica do leite, está à desinfecção dos tetos no pré e pós-ordenha.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do EEP *in vitro* e *in vivo*. Para as análises *in vitro*, foi testada a ação do EEP contra os principais agentes bacterianos causadores de mastite. No experimento *in vivo*, o EEP foi utilizado como sanitizante no manejo de pré e pós-*dipping* em vacas leiteiras das raças Holandesa e Jersey.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite

Entende-se por leite bovino, a secreção láctea da glândula mamária de uma ou mais vacas. Na natureza, o leite é o alimento base para a nutrição do neonato, que apesar de conter alta porcentagem de água, contém uma equilibrada composição de nutrientes (PRATA, 2001).

O leite é constituído por uma mistura complexa, tendo a água como componente mais abundante, onde se encontram em solução os demais compostos, formados principalmente por lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (GONZÁLEZ, 2001; TRONCO, 2003).

Segundo Silva (1997), avalia-se que existem aproximadamente cem mil constituintes no leite, porém, a grande maioria ainda não foi identificada. A composição média do leite bovino é de 87% de água, 3,6% de gordura, 4,9% de lactose, 3,5% de proteínas e 0,7% de sais minerais (PRATA, 2001).

São vários os fatores que podem afetar a composição do leite. A variabilidade dos componentes no leite pode-se dar pela espécie animal, raça, fisiologia (individualidade, idade, período de lactação), alimentação, temperatura do ambiente, doenças e ordenhas (número, intervalo e sistemas), assim como fraudes e adulterações (GONZÁLEZ, 2001; SILVA, 1997).

2.2 Micro-organismos no leite

Quando no interior da glândula mamária de um animal sadio, o leite apresenta-se praticamente livre de micro-organismos, sendo que no momento da ordenha, exposto aos patógenos presentes no ambiente, torna-se susceptível a contaminações quando o processo não for realizado de forma correta. A contaminação do leite também pode ser dada através da penetração de micro-organismos presentes no exterior do úbere, para o interior da glândula mamária através do canal do teto (PRATA, 2001; SANTOS e FONSECA, 2007; TRONCO, 2003).

Quando presentes em altas quantidades, os micro-organismos podem levar o animal a adoecer devido à infecção na glândula mamária. Além de perdas econômicas para o produtor e indústria, a mastite também preocupa pelo fato que o leite de animais enfermos tem a capacidade de ocasionar problemas a saúde pública, quando os alimentos não passarem por processos que os reduzam ou ao menos destruam tais micro-organismos (LANGONI, 2013; PERES NETO e ZAPPA, 2011; TOZZETTI *et al.*, 2008).

De acordo com Pinto (2008), as bactérias são os micro-organismos com maior representatividade no leite, além de estarem presentes leveduras, fungos e vírus.

Através da técnica de coloração de Gram, as bactérias são classificadas em dois grupos: gram-positivas e gram-negativas, conforme as características da parede celular.

Dentre as bactérias gram-positivas, as que possuem maior importância são as bactérias lácticas (famílias *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*), os micrococcos e estafilococos, as bactérias esporuladas (gêneros *Bacillus* e *Clostridium*) e outros representantes patogênicos, como o *Corynebacterium* spp. (TRONCO, 2003).

No grupo das bactérias gram-negativas, as enterobactérias são as mais frequentes no leite. Entre as enterobactérias, os gêneros que tem maior importância para a saúde humana e para o produto final são a *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shingella* spp. Além destas, as *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *Brucella* spp. e *Campylobacter* spp. também podem ser encontradas no leite (TRONCO, 2003).

2.3 Mastite

A mastite é uma doença bastante comum em bovinos leiteiros, ocasionada por micro-organismos que penetram pelo canal do teto, instalando e multiplicando-se no interior da glândula mamária, desencadeando uma inflamação no animal (TRONCO, 2003). Nos animais enfermos, a doença acarreta mudanças físico-químicas na composição do leite e aumento de células somáticas. Além de diminuir a produtividade, o leite proveniente de animais doentes tem sua qualidade afetada, ocorrendo uma diminuição dos teores de gordura, lactose, caseína e minerais (CAVALCANTE, 2004).

A mastite é citada por muitos autores como a principal doença que afeta o setor leiteiro. Esta doença apresenta grande influência na lucratividade dos produtores devido à relação com a queda na produtividade do rebanho infectado, com gastos relativos a tratamento, descarte dos animais doentes e do leite durante o tratamento com antibióticos, dentre outros (LOGUERCIO, 2006; TOMAZI, 2013).

2.3.1 Micro-organismos causadores de mastite

De acordo com Ranjan *et al.* (2006), os principais agentes envolvidos na mastite são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*, responsáveis por aproximadamente 80% dos casos da doença. O *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Nocardia asteroides*, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Serratia spp.* e *Prototheca spp.*, respondem por menos de 5% dos casos. Zafalon *et al.* (2008), afirma que a bactéria *Staphylococcus aureus* é o principal patógeno causador da mastite bovina. Algumas cepas desta bactéria podem produzir enterotoxinas quando o leite for mal refrigerado ou durante a fabricação do queijo com leite cru. Uma vez formada, esta toxina não pode ser destruída pela pasteurização, provocando náuseas, vômitos, cólicas, pressão baixa e temperatura subnormal em humanos (CUNHA e CUNHA, 2007; DTAA, 2003).

2.3.2 Tipos de Mastite – conforme a sintomatologia

2.3.2.1 Mastite Clínica

A mastite clínica é evidenciada com manifestações visíveis, como edema, hipertermia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus no leite. A observação nas alterações do leite pode ser realizada com o auxílio da caneca de fundo preto (TOZZETTI *et al.*, 2008). A mastite clínica é de baixa prevalência, ocorrendo entre 15 a 40 casos subclínicos para cada caso da clínica. (PHILPOT e NICKERSON, 1991).

2.3.2.2 Mastite Subclínica

A forma subclínica é caracterizada por alterações na composição do leite, tais como aumento da CCS, aumento nos teores de proteínas séricas, diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (SANTOS e FONSECA, 2007). Para a detecção da mastite subclínica, pode-se realizar exames físico-químicos do leite, como a CCS e/ou o *California Mastitis Test* (CMT).

A mastite subclínica é responsável por aproximadamente 90-95% dos casos de mastite diagnosticados no Brasil (FONSECA e SANTOS, 2000).

2.3.3 Tipos de Mastite – conforme a forma de contaminação

2.3.3.1 Contagiosa

A mastite contagiosa é provocada por patógenos que sobrevivem na glândula mamária e na superfície da pele dos tetos (OLIVEIRA, 2010). Os principais micro-organismos envolvidos são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis* (BRITO e BRITO, 2009; PARDO *et al.*, 1998). É caracterizada por sua baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos. Geralmente a doença é de longa duração e apresenta alta CCS (PINTO, 2008).

A contaminação sucede muito devido às condições deficientes de higiene durante a ordenha, podendo ser transmitida de um quarto infectado para outro sadio ou de animal para animal, através da mão do ordenhador ou de teteiras (BRITO, 2007; BRITO e BRITO, 2009).

2.3.3.2 Ambiental

A mastite ambiental é causada por bactérias presentes no ambiente, ocorrendo à contaminação nos intervalos entre ordenhas e também durante a ordenha, quando há problemas de funcionamento dos equipamentos (OLIVEIRA, 2010).

Os principais micro-organismos envolvidos são as bactérias gram-negativas e espécies de *Streptococcus*, exceto a *S. agalactiae*. As principais Gram-negativas relacionadas a casos de mastite ambiental são *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* (BRITO e BRITO, 2009; PARDO *et al.*, 1998).

Estes micro-organismos podem ser encontrados em diversas fontes, sendo as principais as fezes, a água de baixa qualidade que é utilizada para a limpeza dos equipamentos, sistemas que utilizam cama sobreposta, e mãos do ordenhador, que podem vir a estar mal higienizadas (BRITO e BRITO, 2009).

2.4 Própolis

A própolis é uma substância coletada pelas abelhas, especialmente pela *Apis Mellifera*, a partir de resinas de brotos de vegetais. Na colméia, a própolis é utilizada para forrar os alvéolos e câmara onde às rainhas depositam os ovos e também serve para vedar as entradas e orifícios da colmeia, além de servir como emulsificante, caso a colmeia seja invadida por algum inseto ou animal que as abelhas não consigam retirar (WIELSE, 1995).

A própolis é composta por aproximadamente 50% de resina e bálsamo de vegetais, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, e de acordo com isto, a composição da própolis é o reflexo da flora vegetal da região onde as abelhas coletam as resinas (WIELSE, 1995; RUSSO *et al.*, 2002).

O uso da própolis como tratamento terapêutico natural pelo homem vem de mais de 300 a.C.(DA SILVA *et al.*, 2006). Diversas civilizações detinham conhecimento sobre as propriedades benéficas da própolis e a empregavam para distintas finalidades. Os Egípcios utilizavam a própolis para embalsamar cadáveres, pois conheciam suas propriedades anti-putrefativas. Incas também a utilizavam como um agente antipirético (CASTALDO e CAPASSO, 2002).

Atualmente, a própolis vem ganhando espaço em pesquisas relacionadas com qualidade de alimentos, buscando eliminar micro-organismos patogênicos em produtos *in natura*, em pesquisas com sanidade animal, em doenças graves como câncer e AIDS, entre outras aplicações (ANDRADE *et al.*, 2012; BANSKOTA, *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2000).

São muitos os compostos ativos que possuem ação terapêutica comprovada, presentes na própolis. Aproximadamente 200 componentes diferentes já foram identificados em própolis de diferentes origens, entre os quais os principais são os flavonoides, ácidos aromáticos, fenólicos e alifáticos, aldeídos, ésteres e aminoácidos (MARCUCCI, 1995; VARGAS *et al.*, 2004)

Os estudos com relação á ação antimicrobiana do EEP vem sendo desenvolvidos há muitos anos, sendo que o principal empecilho é a diversificada composição do extrato, que apresenta variação conforme a região e vegetação disponíveis para a coleta pelas abelhas, assim como a época e a seletividade de cada colmeia (MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002). Diante disto, estudos relacionados à composição e a ação terapêutica da própolis oriunda de regiões distintas são necessários para verificar a eficácia das propriedades do EEP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

O experimento *in vivo* foi desenvolvido em uma propriedade rural, localizada na Região da Campanha Gaúcha, município de Dom Pedrito – RS e os estudos *in vitro* foram realizados no laboratório de Parasitologia e Microbiologia da Universidade Federal do Pampa, Campus Dom Pedrito – RS, Brasil.

O presente estudo foi desenvolvido entre os meses de Março e Junho de 2016. O experimento *in vivo* teve duração de 35 dias.

3.2 Animais

Foram utilizadas 9 vacas multíparas das raças Holandesa e Jersey, com período de lactação entre 90 e 180 dias. Os animais foram divididos em dois grupos e manejados com pré e pós-*dipping* diariamente, durante todo o período experimental, de acordo com o tratamento. O grupo 1, controle, com cinco animais manejados no pré e pós-*dipping* com solução iodada a 0,2% e grupo 2, quatro animais manejados com EEP a 30% (p/v) no pré e pós-*dipping*.

A fim de selecionar apenas animais com úbere saudável, foi realizado o CMT, conforme pode ser visualizado na Figura 1. O CMT foi realizado logo após a entrada dos animais na sala de ordenha. Foi utilizado o reagente comercial do CMT e o teste foi realizado segundo a metodologia de Langenegger *et al.* (1970). Para a interpretação dos resultados, seguiu-se a metodologia de Schalm e Noorlander (1957), onde o escore 1 indica uma reação completamente negativa, o escore 2 sendo uma reação suspeita, o 3: reação fracamente positiva (+), 4: reação positiva (++) e 5: reação fortemente positiva (+++).

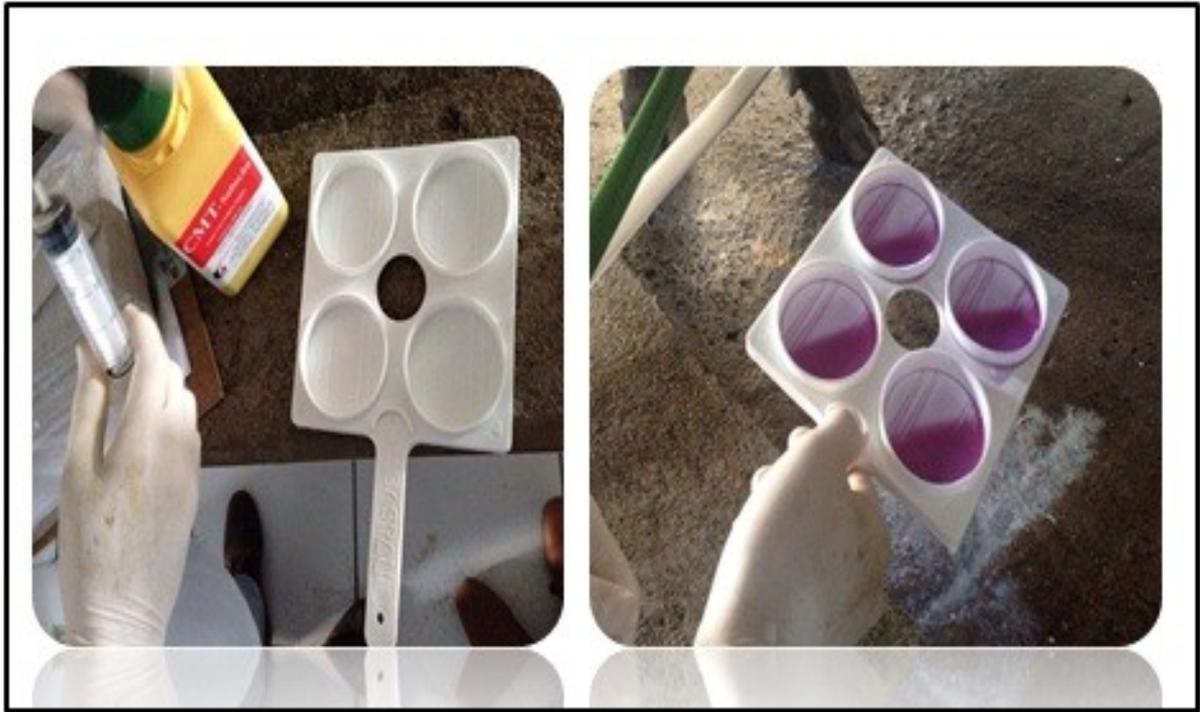
Animais que apresentaram em, pelo menos um dos tetos, resultados superiores a uma cruz ao teste, foram eliminados do experimento.

O manejo preparatório para a ordenha foi realizado da seguinte forma para cada grupo:

- Grupo 1: imersão dos tetos na solução iodada e secagem com papel toalha;

- Grupo 2: imersão dos tetos no EEP a 30% e secagem com papel toalha.

Figura 1 – Aplicação do *California Mastitis Test* no rebanho



Fonte: A autora, 2016.

3.3 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis

A própolis utilizada no experimento foi extraída de colmeias de abelhas Africanizadas, localizados na Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

A própolis bruta foi coletada por raspagem e posteriormente fragmentada e macerada. Para a obtenção do EEP, utilizou-se álcool 96°GL, na proporção de 70%, obtendo-se assim, o extrato de própolis a 30%. Este extrato foi acondicionado em frascos âmbar por 42 dias consecutivos onde se procedeu a agitação diária de 30 segundos, conforme Franco e Bueno (1999). Ao término, obteve-se o extrato etanólico de própolis por meio de filtração. A leitura do teor alcoólico do EPP final foi obtida com a ajuda de um alcoômetro, tendo como resultado 67°GL.

3.4 Micro-organismos

Para a realização da atividade antimicrobiana *in vitro* e da concentração inibitória mínima (CIM) do EEP, foram utilizadas cepas bacterianas padronizadas de *Escherichia coli*, derivada do *American Type Culture Collection* (ATCC) 8739, *Staphylococcus aureus*, derivada ATCC 25923, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus lugdunensis*. As demais bactérias utilizadas foram obtidas de isolamento de campo, através da coleta de leite e da superfície de tetos de bovinos leiteiros. São elas: *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* sp., *Micrococcus* spp. *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp.

3.5 Preparo dos inócuos bacterianos para testes *in vitro*

As cepas dos micro-organismos estavam isolados em meio ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e com o auxílio de uma alça de platina, foram diluídas em solução salina estéril a 0,85% até alcançar a turbidez de 0,5 na escala nefelométrica de *MacFarland*, o que equivale aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL.

3.6 Coletas

3.6.1 Superfície dos tetos

Foram examinados os quatro tetos de todos os animais participantes, antes e após os manejos de pré-*dipping* em três coletas, realizadas nos dias 0, 17 e 35.

O material para exame bacteriológico de cada teto foi obtido com auxílio de *swab*. O *swab* foi confeccionado em laboratório e posteriormente esterilizado em cabine de fluxo laminar, com luz ultravioleta (UV), por 90 minutos. Foram realizados dois movimentos circulares sobre a área do esfíncter dos tetos. Em cada animal, foi aplicado o *swab* em dois momentos distintos do pré-*dipping*. Primeiro logo após a entrada dos animais na sala de ordenha e segundo, após a imersão dos tetos por aproximadamente 30 segundos nas soluções iodada e do EEP. Após a coleta, cada *swab* foi colocado em tubos de ensaio, contendo 10mL de salina estéril a 0,85%.

Desde o momento da coleta até a realização dos exames no laboratório, as amostras permaneceram mantidas em recipiente isotérmico.

3.6.2 Leite

As coletas do leite para as análises foram realizadas após a higienização dos tetos. Foram descartados os primeiros 3 jatos de leite de cada teto e posteriormente, coletados 40mL de leite de cada animal em frascos estéreis e mantidos em caixas isotérmicas até o momento das análises laboratoriais, que ocorreram uma hora após as coletas.

3.7 Testes

3.7.1 Contagem de células somáticas

A CCS foi determinada por microscopia direta, onde um volume de 1uL de leite foi distribuído homogeneamente sobre uma área de 1cm² de uma lâmina para microscópio. Após a secagem, as lâminas foram tratadas com xilol 1% e etanol absoluto para remoção de gordura, em seguida coradas com panótico rápido e posteriormente, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico.

Para cada amostra de leite, foi preparada uma lâmina com dois esfregaços. Em cada lâmina, vinte campos de um esfregaço foram contados e a média das contagens multiplicada pelo fator microscópico e o resultado final, multiplicado por 1000 para se determinar o número CCS/mL da amostra.

3.7.2 Contagem padrão em placas de micro-organismos

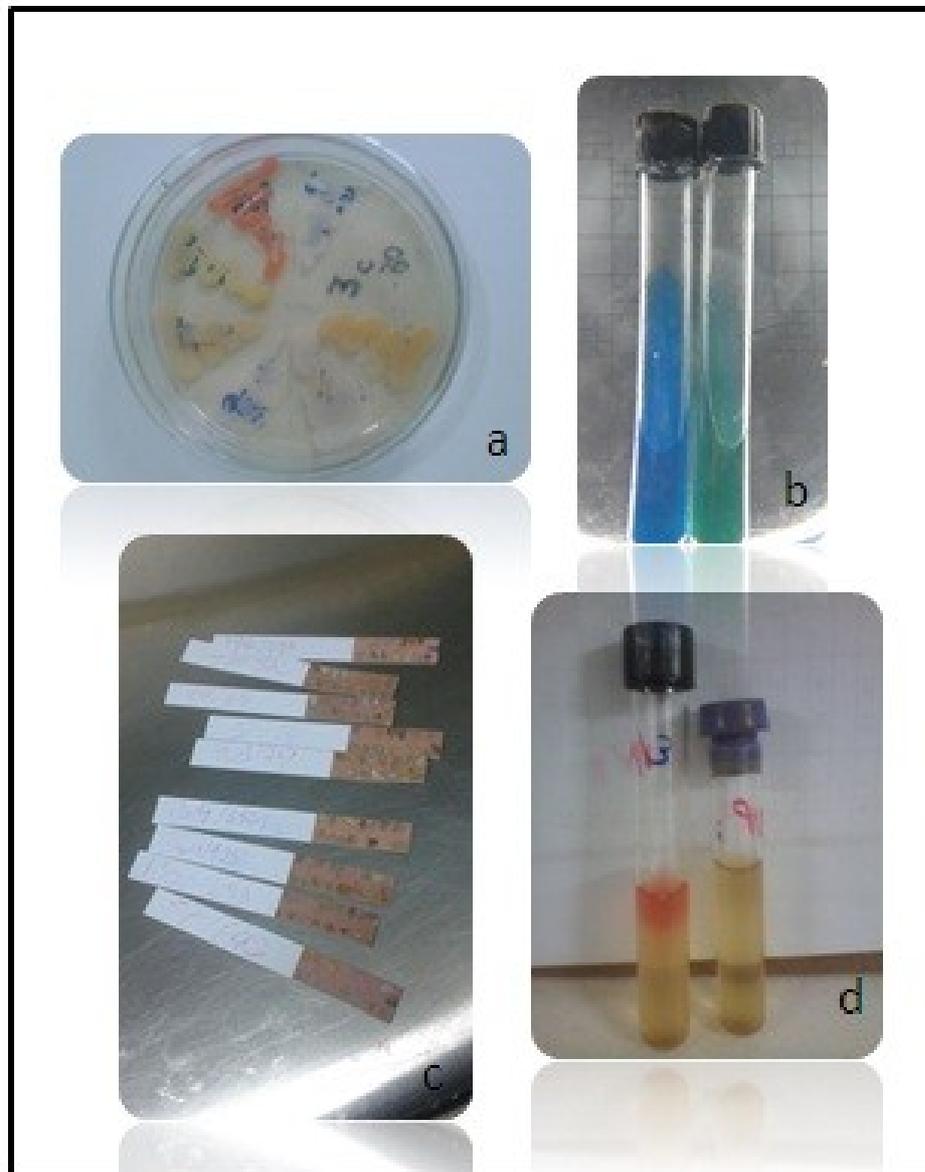
Foram realizadas as CPP para as amostras de leite e da superfície de tetos. Após a chegada das amostras no laboratório, procedeu-se a diluições seriadas destas em 1:10, 1:100 e 1:1000. Em seguida, 100µL das diluições foram inoculadas por espalhamento, pela técnica de *spread-plate* em placas de Petri contendo meio Ágar Padrão para Contagem (PCA), para micro-organismos aeróbios mesófilos. As

placas foram incubadas á 35°C em condições de aerobiose por 48 horas. Posteriormente, foram contabilizadas as unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) através da média aritmética das três placas de cultura.

3.7.3 Isolamento bacteriano

As amostras coletadas do leite e dos quartos mamários dos animais experimentais foram destinadas à realização de isolamento e tipificação bacteriana. Nas placas de PCA, as colônias crescidas com morfologia diferente umas das outras, foram repicadas em meios específicos, como o ágar *MacConkey* e BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as colônias foram submetidas a provas morfológicas e tintoriais por meio da técnica de coloração de Gram e posteriormente, provas bioquímicas, como fermentação de carboidratos, presença de motilidade, catalase, oxidase, utilização de uréia, utilização de citrato, INVIC, demonstradas nas Figuras 2 e 3. (KONEMAN *et al.*, 2001 e QUINN *et al.*, 2005).

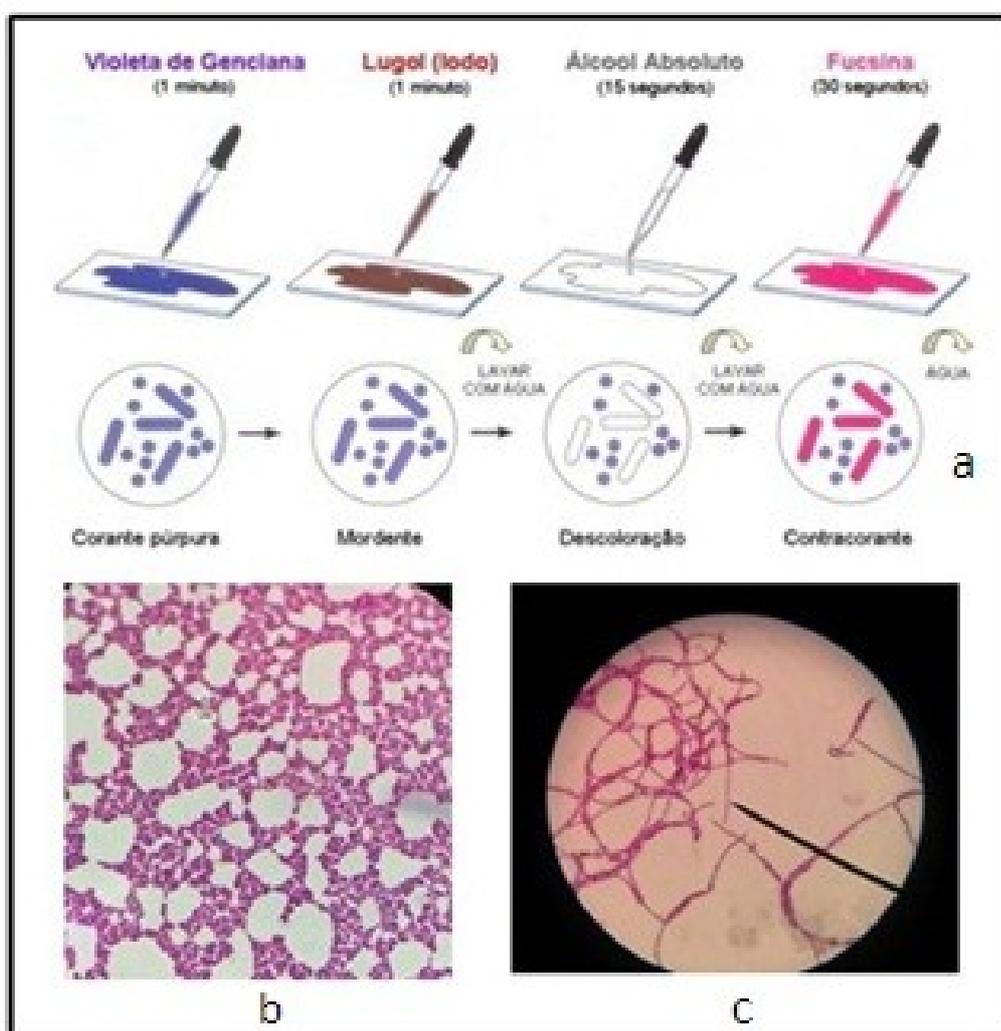
Figura 2 – Ilustrações dos testes realizados para identificação bacteriana



a: crescimento microbiano, b: teste do citrato, c: fitas de oxidase, d: teste de Voges – Proskauer.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 3 – Ilustrações da técnica de Gram



a: procedimentos para técnica de Gram, b: *Staphylococcus spp.*, c: bacilos Gram-negativos.
Fonte: A autora, 2016.

3.7.4 Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis a 30%, iodo a 2% e álcool 67°GL

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do EEP na concentração de 30%(p/v) e do iodo a 0,2%, foi utilizado o método de difusão em ágar, com meio de cultura ágar BHI. Foi realizada também a análise da atividade antimicrobiana do álcool 67°GL, a fim de controlar o efeito do solvente. Como controle, foram preparadas placas com meio de cultura inoculado com as suspensões bacterianas. Os inócuos foram preparados seguindo a metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, de acordo com a norma M7-A6 (2006). Após, 100µl das

suspensões foram espalhadas sobre a superfície do ágar com o auxílio de uma alça de Drigalski, todos em duplicata.

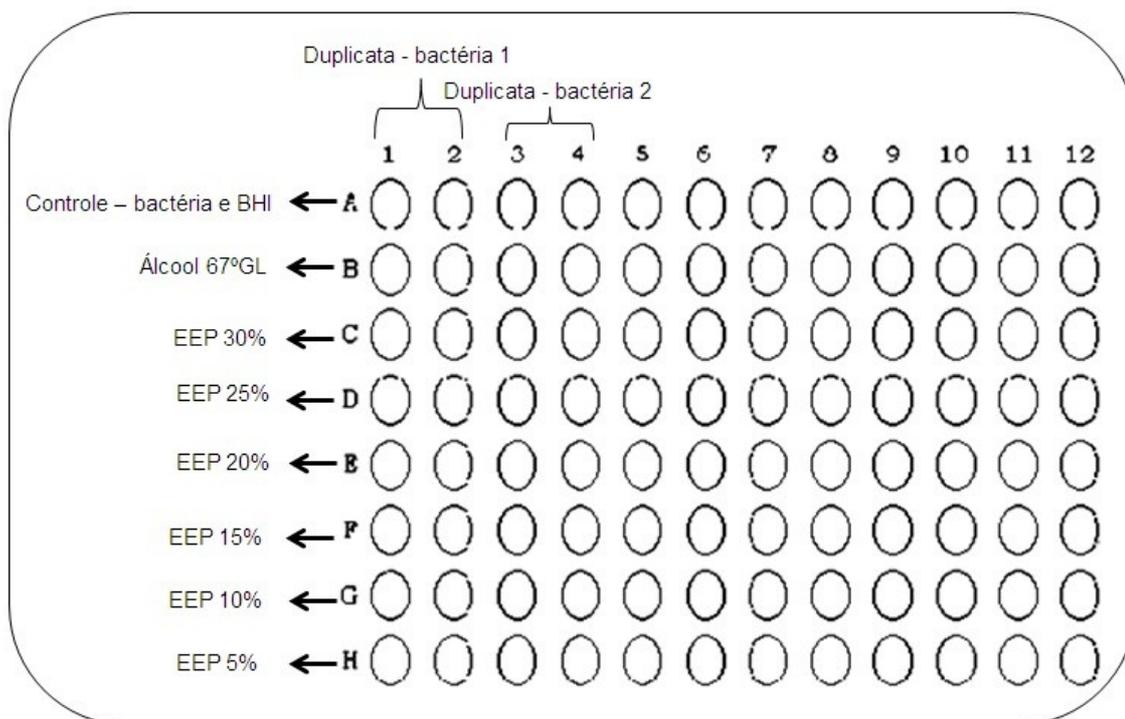
As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas para observação do crescimento bacteriano e posterior contagem das unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). Foram consideradas sensíveis aos tratamentos (EEP, iodo e álcool) as bactérias das quais não foi observado crescimento no meio de cultura.

3.7.5 Concentração inibitória mínima

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de acordo com a metodologia descrita por Duarte *et al.* (2003), com modificações. Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 20µL de EEP em diferentes concentrações ((30, 25, 20, 15, 10 e 5% (p/v)), 10µL dos inócuos bacterianos e 170µL de BHI Ágar. Como controle positivo foi utilizado apenas o meio de cultura (BHI) com o inócuo e cada ensaio também incluiu a verificação do efeito do solvente do extrato, álcool 67°GL, sobre o crescimento microbiano. As microplacas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foram realizadas leituras com o revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), a 2%. Foram adicionados 20µL do TTC em cada orifício das microplacas. Após 2 horas, procedeu-se a leitura através da verificação da coloração dos poços, onde os que permaneceram incolores, não apresentaram crescimento microbiano e os poços que coraram de vermelho-roxo, indicaram o crescimento microbiano. Os testes foram realizados em duplicata. A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada a CIM a menor concentração do EEP capaz de inibir o crescimento bacteriano.

A Figura 4 demonstra esquematicamente o teste de CIM nas microplacas de 96 poços.

Figura 4 – Esquema utilizado para determinar a concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição



Fonte: A autora, 2016.

3.8 Análises estatísticas

Os resultados do experimento *in vivo* foram analisados por meio do software SAS, pelo teste de médias de Tukey a 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Por meio deste estudo procurou-se demonstrar o potencial antimicrobiano do EEP em testes *in vitro* e *in vivo* contra agentes bacterianos que causam mastite bovina.

Os resultados *in vitro*, resultantes do teste de inibição do EEP com concentração de 30% (p/v) frente às bactérias causadoras de mastite, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Contagem das unidades formadoras de colônias de bactérias que causam mastite, em função da ação do extrato etanólico de própolis à 30% (p/v), álcool 67°GL e iodo a 0,2%

	Bactérias	Iodo 0,2% UFC	Álcool 67°GL UFC	EEP 30% (p/v) UFC
Gram-positivas	<i>S. aureus</i>	Incontáveis	110	0
	<i>S. lugdunensis</i>	Incontáveis	520	0
	<i>Bacillus</i> spp.	150	200	0
	<i>Corynebacterium</i> spp.	incontáveis	1070	660
	<i>Micrococcus</i> spp.	incontáveis	incontáveis	incontáveis
	<i>Streptococcus</i> spp.	incontáveis	incontáveis	0
Gram-negativas	<i>E. coli</i>	incontáveis	incontáveis	0
	<i>S. warneri</i>	incontáveis	1600	1070
	<i>Citrobacter</i> sp.	6000	incontáveis	0
	<i>Enterobacter</i> spp.	incontáveis	incontáveis	0
	<i>Klebsiella</i> sp.	incontáveis	incontáveis	0
	<i>Pseudomonas</i> sp.	incontáveis	1500	0
	<i>Salmonella</i> sp.	incontáveis	incontáveis	0

Fonte: A autora, 2016.

O EEP na concentração de 30% (p/v) inibiu o crescimento de 77% das bactérias testadas. Entre as Gram-positivas, o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp. não apresentaram crescimento devido a ação inibitória do EEP. Esses resultados são relevantes à medida que estes micro-organismos estão envolvidos nos casos de mastite (TRONCO, 2003).

A própolis possui a capacidade de inibição do crescimento bacteriano ao prevenir a divisão celular, desorganizar o citoplasma, a membrana plasmática e a parede celular, causando uma bacteriolise parcial, inibindo a síntese de proteínas (Takaisi-Kikuni e Schilcher, 1994).

Fiordalisi (2014) e Sforcin *et al.* (2000), verificaram que cepas de *Staphylococcus aureus* são inibidas pelo EEP, resultados estes que corroboram com os encontrados neste trabalho.

Quanto as bactérias Gram-negativas, o EEP teve ação antimicrobiana sobre os gêneros *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter spp.* e *Salmonella sp.* e também inibiu o crescimento da *Escherichia coli*.

A concentração de 30% do EEP não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano do *Staphylococcus warneri*, porém, vale-se ressaltar que esta cepa, assim como o *Corynebacterium spp.*, apresentaram melhores resultados com o EEP, quando comparado aos encontrados pelo álcool e iodo.

O álcool a 67°GL não apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, o que indica que a ação antimicrobiana observada pelo EEP não foi devida ao álcool utilizado como solvente na preparação do extrato. Todos os isolados apresentaram crescimento. As cepas de *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *S. warneri* e *Pseudomonas sp.*, mostraram-se mais sensíveis ao álcool que as demais, variando de 100 a 1600 UFC/mL, contudo, o álcool não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, apenas diminuir sua proliferação.

Demais estudos envolvendo a atividade antibacteriana do EEP também demonstraram que o álcool, utilizado como controle, não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Loguercio *et al.* (2006), em experimento com *Staphylococcus spp. coagulase-positivo* e *Streptococcus spp.*, verificou que os isolados foram capazes de crescer nos meios com álcool 96°GL.

Dos Santos *et al.* (2003), testando a atividade antibacteriana do álcool 70°GL, constatou que cepas de *Staphylococcus aureus* não apresentaram halo de inibição, confirmando a baixa ação bacteriana do álcool.

Observando-se os resultados encontrados no tratamento com iodo a 0,2%, verifica-se crescimento bacteriano para todas as cepas testadas, o que indica claramente a ausência de inibição do iodo frente às principais bactérias causadoras de mastite em rebanhos leiteiros. Os gêneros *Citrobacter sp.* e *Bacillus spp.* mostraram-se sensíveis ao iodo, apresentando respectivamente, 6000 e 150UFC/mL.

Silva *et al.* (2015), em experimento *in vitro*, avaliando a sensibilidade de estirpes de *S. aureus* frente a diferentes desinfetantes comerciais, observou que o

iodo na concentração de 1 e 2%, foi capaz de inibir o crescimento microbiano, sendo que na concentração de 0,5%, o iodo não demonstrou inibição.

Foi utilizada no experimento a solução iodada na concentração de 0,2% para o pré-dipping, pois em concentrações maiores de 1% e a 2%, embora apresentem melhor desempenho *in vitro* contra microrganismos, quando utilizada nessas concentrações, podem vir a causar contaminação de iodo no leite (JONES, 1998; LOPES *et al.*, 2013).

O teste de CIM do EEP com concentrações distintas, em relação às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas abaixo relacionadas, pode ser observado na Tabela 2 e Figura 5.

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima do extrato etanólico de própolis em diferentes concentrações

	Bactérias	EEP					Álcool	
		30%	25%	20%	15%	10%	5%	67°GL
Gram-positivas	<i>Micrococcus</i> spp.	S	S	S	S	S	R	R
	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R
	<i>S. lugdunensis</i>	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Bacillus</i> spp.	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Corynebacterium</i> spp.	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Streptococcus</i> spp.	S	S	S	S	S	S	R
Gram-negativas	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	R	R
	<i>Pseudomonas</i> sp.	S	S	S	S	S	R	R
	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	R	R
	<i>Salmonella</i> sp.	S	S	S	S	S	R	R
	<i>S. warneri</i>	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Klebsiella</i> sp.	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Citrobacter</i> sp.	S	S	S	S	S	S	R

S – sensível, R – resistente

Fonte: A autora, 2016.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o crescimento de todas as bactérias foi inibido com o EEP nas concentrações de 30, 25, 20, 15 e 10%. A CIM para os gêneros *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* sp. e *Citrobacter* sp. e as cepas de *E. coli* e *Staphylococcus warneri* foi obtida com EEP a 5%. Os gêneros *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* spp. e *Salmonella* sp. e as estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus lugdunensis* apresentaram como CIM, EEP a 10%.

Conforme pode ser observado, o EEP inibiu o crescimento de 5 das 6 bactérias Gram-positivas testadas (83%) na concentração de 5% do extrato, ao

modo que na mesma concentração, nas Gram-negativas, o EEP inibiu o crescimento de 3 das 7 cepas (42%) e o restante das bactérias demonstraram inibição ao extrato na concentração de 10%. A menor CIM, com EEP 5% (p/v), mostrou-se mais eficiente contra as bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Grange e Davey (1990), Marcucci (1996), Menezes (2005) e Júnior (2012), que apontaram susceptibilidade das bactérias gram-positivas por concentrações baixas de EEP, enquanto que as bactérias gram-negativas necessitaram de maiores concentrações do extrato para sua inibição.

Sforcin *et al.* (2000) verificaram que cepas de *Staphylococcus aureus* são susceptíveis a baixas concentrações de própolis, resultados estes que corroboram com os encontrados no presente estudo. Ainda conforme Sforcin *et al.* (2000), a CIM mais alta para as Gram-negativas pode ser explicada devido à complexidade química da parede celular destas bactérias, sendo considerada esta, um dos fatores limitantes para a atividade da própolis.

A resistência de todas as cepas quanto ao álcool observada neste experimento demonstra a sua pouca atividade antimicrobiana. Resultados semelhantes foram encontrados por Casquete *et al.* (2016), Loguercio *et al.* (2006) e Dos Santos *et al.* (2003).

Quando observado os resultados obtidos na Tabela 1 e Tabela 2, pode-se analisar que todas as cepas testadas no ensaio de microdiluição, foram sensíveis ao EEP a 10% (p/v), porém *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp e *S. Warneri* não apresentaram inibição do crescimento com EEP a 30% (p/v) no teste da atividade antimicrobiana em diluição em Ágar. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que os ensaios *in vitro* não foram realizados no mesmo dia, podendo ter ocorrido troca de espécie entre os gêneros, já que não foram realizados testes bioquímicos para o isolamento das bactérias por espécie.

É de extrema importância promover experimentos que avaliem a atividade da própolis de diferentes regiões, pois se sabe que a ação antimicrobiana da própolis é influenciada pela sua composição química. Desse modo, torna-se relevante estudos que correlacionam a composição química da própolis distintas com suas atividades biológicas, buscando com isso estabelecer a CIM de própolis de diferentes regiões. Isso reduziria o desperdício do produto, visto que a própolis tem valor agregado no mercado.

Figura 5 – Leitura da concentração inibitória mínima do extrato em placas de microdiluição



Poços amarelados: sem crescimento bacteriano, poços arroxeados: com crescimento bacteriano.

Fonte: A autora, 2016.

A distribuição dos diferentes micro-organismos presentes nas análises de leite durante o período experimental está apontada na Tabela 3.

Tabela 3 – Frequência dos micro-organismos isolados do leite bovino

	Micro-organismos	Frequência	%	%
Gram-positivas	<i>Staphylococcus</i> spp.	21		46,7
	<i>Streptococcus</i> spp.	10	91	22,2
	<i>Bacillus</i> spp.	6		13,4
	<i>Corynebacterium</i> spp.	4		8,9
Gram-negativas	<i>E. coli</i>	1		2,2
	<i>Enterobacter</i> spp.	1		2,2
	<i>Citrobacter</i> sp.	1	9	2,2
	<i>Shigella</i> sp.	1		2,2
	Total	45	100	100

Fonte: A autora, 2016.

As bactérias Gram-positivas apresentaram frequência de 91% dos microorganismos isolados e caracterizados do leite, enquanto que as Gram-negativas estiveram presentes em 9% dos isolados. Os resultados encontrados vão ao encontro de Menezes *et al.* (2014), que relata uma taxa máxima de 10% de bactérias Gram-negativas no leite proveniente de animais saudáveis. Segundo Lima (1998), a microbiota presente no leite é composta normalmente por bactérias, sendo as leveduras e fungos mais raros de serem encontrados. De acordo com Jay (1998), em condições adequadas de manipulação e armazenamento, predomina a flora Gram-positiva.

Staphylococcus spp. e *Streptococcus* spp. foram os gêneros com maior frequência no leite, com um total de 68,9% das bactérias encontradas, seguido pelo *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp., com respectivamente 13,4 e 8,9% de frequência. Estirpes de *E.coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* sp. e *Shigella* sp, tiveram frequência de apenas 2,2%.

A alta frequência do gênero *Staphylococcus* spp. foi ao encontro dos dados apresentados por Melo *et al.* (2013), que analisando bactérias isoladas de amostras de leite no estado de Pernambuco, observou a presença de 51,2% desta bactéria frente aos demais isolados.

Resultados similares foram encontrados por Andrade (2010), onde os microorganismos isolados com maior frequência em amostras de leite bovino foram respectivamente os gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Fonseca e Santos (2000), relatam que a alta frequência de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. no rebanho, podem apresentar risco a saúde da glândula mamária dos bovinos, pois esses agentes estão relacionados entre os principais causadores de infecções subclínicas, o que ocasiona perda de produção e da qualidade do leite.

A contaminação do leite pode ser dada através de duas vias: a endógena, quando o animal apresenta no interior da glândula mamária, bactérias que possuem a capacidade de se instalarem e multiplicarem neste ambiente, podendo vir a causar posteriormente, um processo inflamatório e exógena, quando a contaminação ocorre após o leite ser ordenhado (TRONCO, 2003). Os patógenos isolados da superfície dos tetos estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4 – Frequência dos patógenos bacterianos isolados da superfície da pele dos tetos

Micro-organismos		Frequência	%	%
Gram-positivas	<i>Staphylococcus</i> spp.	39	82,4	42,9
	<i>Corynebacterium</i> spp.	18		19,7
	<i>Streptococcus</i> spp.	7		7,8
	<i>Bacillus</i> spp.	6		6,5
	<i>Micrococcus</i> spp.	5		5,5
Gram-negativas	<i>Enterobacter</i> spp.	5	17,6	5,5
	<i>Klebsiella</i> sp.	2		2,2
	<i>Proteus</i> sp.	2		2,2
	<i>Pseudomonas</i> sp.	2		2,2
	<i>Acinetobacter</i> sp.	1		1,1
	<i>Citrobacter</i> sp.	1		1,1
	<i>E. coli</i>	1		1,1
	<i>Pasteurella</i> sp.	1		1,1
	<i>Shigella</i> sp.	1		1,1
Total		91	100	100

Fonte: A autora, 2016.

Os resultados demonstram a alta frequência de bactérias Gram-positivas na superfície dos tetos (82,4%), sendo os gêneros *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. as principais bactérias encontradas, com respectivamente 42,9, 19,7 e 7,8% de frequência em relação aos demais isolados.

A alta frequência de *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp., encontrados na superfície dos tetos dos animais é explicada pelo fato de que a pele do úbere e a dos tetos são os principais sítios de localização desses agentes. (ZADOKS *et al.*, 2002 e ZANETTE *et al.*, 2010).

A frequência de *Staphylococcus* spp. isolados no leite (46,7%) e na superfície dos tetos (42,9%), indica que existe relação entre o aparecimento deste micro-organismo no leite, com sua presença na superfície dos tetos, o que acaba facilitando a sua penetração e posterior contaminação do leite (MYLLYS *et al.*, 1997).

O fato de que apenas animais com glândula mamária saudável foram utilizados no experimento, explica a baixa incidência de bactérias Gram-negativas (17,6%), pois as altas frequências destes micro-organismos no úbere levam a

infecções graves nos animais, causando mastite clínica generalizada no rebanho e a (PEIXOTO *et al.*, 2012). Altas taxas de presença destes micro-organismos nos animais causam a chamada mastite ambiental.

Os resultados encontrados na contagem de micro-organismos antes e após a aplicação do pré e pós-*dipping* para ambos os grupos experimentais, não foram bem sucedidos devido à metodologia empregada, e deste modo, não foram considerados para este trabalho.

Para o experimento *in vivo*, os animais foram separados em grupos homogêneos, selecionando-se apenas animais com glândula mamária saudável. Os valores médios de CCS/mL e de CPP/mL dos animais de ambos os tratamentos ao longo do período experimental, podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios das contagens de células somáticas e contagem de aeróbios mesófilos no leite

Médias	Tratamentos		CV	P
	Iodo	Própolis		
CCS/mL (0)	107.800	176.400 ^a	29,86	0,0339*
CCS/mL (17)	232.700	245.000		
CCS/mL (35)	127.400	98.000 ^b	46,12	0,4816
CPP/mL (0)	29.013	19.638	54,13	0,3529
CPP/mL (17)	83.920	82.420		
CPP/mL (35)	27.400	19.300	80,95	0,6076

CCS/mL – contagem de células somáticas/mL, CPP/mL – contagem de aeróbios mesófilos /mL, CV – coeficiente de variação, P – *diferença significativa entre tratamentos, a,b – diferença significativa no tratamento.

Fonte: A autora, 2016.

Analisando os resultados encontrados em ambos os tratamentos, observa-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na CPP/mL do leite comparando-se os valores médios iniciais e finais de cada tratamento. Os resultados encontrados no tratamento de iodo, demonstram CPP/mL de 29.013UFC/mL no leite inicial 27.400UFC/mL no leite ao final do experimento. O tratamento com o a aplicação do EEP no manejo de pré e pós-*dipping* apresentou CPP/mL com 19.638UFC/mL e 19.300UFC/mL nas coletas iniciais e finais, respectivamente. Os resultados encontrados para CCS/mL e CPP/mL nos animais de ambos os grupos estão dentro do preconizado pela legislação (BRASIL, 2011).

Os resultados acima revelam o aumento da CPP/mL e CCS/mL no dia 17 para ambos os grupos experimentais. Este fato deve-se provavelmente as chuvas

torrenciais que ocorreram na região durante este período. Nestas condições, o acúmulo de lama nas instalações e o aumento da sujidade nos quartos mamários, podem ter causado esta elevada contaminação no leite. Estes resultados vão ao encontro dos observados por Bueno *et al.* (2008) e Takahashi *et al.* (2012) que verificaram relação entre os aumentos de contagem bacteriana do leite de acordo com as variações na precipitação pluviométrica.

Quanto à contagem de células somáticas, foi observado que os animais do grupo do iodo não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) entre o início e final do tratamento. Foi analisado que os animais manejados com o EEP, apresentaram melhora na CCS/mL, diferindo estatisticamente ($P < 0,05$).

Estes resultados vão ao encontro dos analisados por Hoepers *et al.* (2011), que observou diminuição da CCS/mL nos animais com mastite subclínica, tratados com EEP na concentração de 35%, com período experimental de 26 dias.

Ataides *et al.* (2012), avaliando o uso da solução alcoólica de própolis e do iodo no pré e pós-*dipping* em animais com mastite subclínica, durante 10 dias, observou que não houve diferença significativa na CCS/mL entre os tratamentos, resultados estes que corroboram com os encontrados neste trabalho. A diminuição significativa na CCS/mL observada neste trabalho leva a entender que o EEP agiu como anti-inflamatório sobre a glândula mamária dos animais do grupo 2, durante os 35 dias de tratamento.

A adequada higiene no momento da pré e pós-ordenha são medidas importantes que auxiliam na prevenção de infecções intramamárias, pois existe relação direta entre a taxa de contaminação na superfície dos tetos com a taxa de infecções intramamárias nos bovinos. Assim, procedimentos visando à redução da contaminação nos tetos, atuam na prevenção e controle dos casos de mastite e consecutivamente, na redução da CCS/mL e da CPP/mL no leite (SOUZA *et al.*, 2005 e SANTOS, 2010).

Vale lembrar que as bactérias isoladas na superfície dos tetos dos animais são habitantes normais do ambiente, e poderão vir a causar mastite ou contaminação do leite, se houverem condições favoráveis ao seu desenvolvimento. É de responsabilidade dos técnicos a implantação de práticas de manejos que minimizem o estabelecimento e a proliferação destes micro-organismos.

O EEP oriundo da Região Noroeste do estado do RS-Brasil mostrou-se eficaz nos testes de atividade antimicrobiana em ensaios *in vitro* e *in vivo*, contra os

principais micro-organismos envolvidos em casos de mastite em bovinos leiteiros. Em ensaio *in vivo*, o EEP na concentração de 30% (p/v), mostrou-se benéfico na sanitização dos quartos mamários antes e após a ordenha dos animais, porém, os resultados *in vitro*, demonstraram que na concentração de 10% (p/v), o EEP foi efetivo na inibição de todas as bactérias testadas, o que aumenta o rendimento da própolis bruta utilizada na preparação do extrato.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O EEP na concentração de 30% (p/v), nos ensaios *in vitro*, apresentou atividade antimicrobiana frente as principais bactérias que causam mastite em bovinos leiteiros. Foi observada a CIM contra todas as bactérias analisadas, com EEP a 10% (p/v).

O solvente utilizado no preparo de extrato etanólico de própolis não demonstrou atividade antimicrobiana frente as bactérias testadas *in vitro*.

O iodo na concentração de 0,2%, nos ensaios *in vitro*, não se mostrou eficaz, porém no estudo *in vivo*, a utilização da solução iodada a 0,2% manteve a qualidade microbiológica do leite e do estado sanitário dos animais (CPP/mL e CCS/mL), dentro do preconizado pela IN-62.

Os resultados *in vivo* demonstram que o EEP utilizado no pré e pós-*dipping*, apresentou diminuição significativa na CCS/mL, podendo ser utilizado como desinfetante alternativo para o manejo de pré e pós-imersão dos tetos de bovinos, visto que apresenta ação antimicrobiana contra as principais bactérias que causam mastite, sendo benéfica à prevenção desta enfermidade.

As principais bactérias isoladas do leite dos animais de ambos os grupos experimentais foram respectivamente, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Bacillus* spp.

Os micro-organismos de maior frequência isolados da superfície dos quartos mamários foram respectivamente, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp.

Destaca-se que são necessárias mais pesquisas na área, uma vez que a própolis é uma substância que apresenta diferença na sua composição de acordo com a região onde é coletada, e por este modo, suas propriedades biológicas também são distintas.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, U.V.C. Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós – imersão de tetos de vacas leiteiras. Curitiba, 2010.

ANDRADE, N.P.C.; DA SILVA, E.M.S.; MOTA, R.A.; VESCHI, J.L.A.; RIBEIRO, M.F.; KREWER, C.C.; DA COSTA, M.M. Atividade Antimicrobiana *In Vitro* de Extratos Etanólicos de Própolis de Três Estados Brasileiros Sobre *Aeromonas Hydrophila* Isoladas de Peixes. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.79, n.1, 9-15p., 2012.

ATAIDES, A.C.C.; SILVA, M.A.P.; CARMO, R.M.; SILVA, R.C.F.; MELO, A.F.; SILVA, F.R. Uso da solução alcoólica de própolis no controle de mastite subclínica em vacas leiteiras. **I Congresso de Pesquisa e Pós-graduação do Campus Rio Verde**, 2012.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n.1, 239-246p., 2000.

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, p. 6, Seção 1, 30 de dezembro de 2011.

BRITO, J.R.F.; PAIVA e BRITO, M.A.V.; VERNEQUE, R.S. Contagem Bacteriana da Superfície de Tetos de Vacas Submetidas a Diferentes Processos de Higienização, Incluindo a Ordenha manual com Participação do Bezerro para Estimular a Descida do Leite. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.5, 847-850p., 2000.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite. In: F.H. Madalena; L.L. de Matos; E.V. Holanda Jr. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 61-74p., 2001.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.P.; MENDONÇA, P.T. **Prevenção e Controle de Mastite**. Viçosa: CPT, 236p., 2009.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, A.N.; NICOLAU, A.S.; NEVES, R.B.S. Contagem bacteriano total do leite: relação com a composição centesimal e período

do ano no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.15, n.1, 40-44p., 2008.

CARVALHO, T.C.R.; BOLINA, J.A. C. A.; PINHEIRO, M. L. M. P.; NASCIMENTO, G. C.; ALVES, J. M.; TEIXEIRA, R. B.; NORONHA, C. M. S.; CARVALHO, P. A. R. Uso de diferentes sanitizantes no manejo de pré e pós – dipping de vacas leiteiras - avaliação do escore de sujidade. **V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - campus Bambuí**, V Jornada Científica, 2012.

CASQUETE, R.; CASTRO, S.M.; JACOME, S.; TEIXEIRA, P. Antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis in “Alheira”, a fermented meat sausage. *Food Science & Technology*, 2: 1125774, 1-7p., 2016.

CASTALDO, S. e CAPASSO, F. “Propolis, an old remedy used in modern medicine,” **Fitoterapia**, v. 73, 1-6p., 2002.

CASTRO, M. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n.7, 1512-1516p., 2007.

CAVALCANTE, F. L. **Manejo necessário no rebanho leiteiro para uma boa ordenha**. Boletim técnico. Rio Branco-AC: Embrapa, 12p., 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 7.ed. CLSI document M7- A6. Walle, 2006.

COELHO, M. DE S. SILVA, J.H.V.; OLIVEIRA, E.R.A. AMÂNCIO, A.L.L. SILVA, N.V. LIMA, R.M.B. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Archivos Zootecnia**, v.59, 95-112p., 2010.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *S. aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.2, n.1, 105-114p., 2007.

DA SILVA, J.F.M; SOUZA, M.C; MATTA, S.R; ANDRADE, M.R; VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chem**, v. 99, 431-435p., 2006.

DOS SANTOS, C.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, 71-74p., 2003.

DTAA – Divisão de Doenças de Transmissão Alimentar e por Água. Manual das doenças transmissíveis por alimentos. **Informe – NET DTA**, 2003.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGALI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *Mutans streptococci*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.4, 527-531p., 2003.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, 315-320p., 2004.

FIORDALISI, S.A.L. Extratos de própolis no tratamento da mastite bovina: avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e da viabilidade celular em explantes da glândula mamária. Florianópolis, 2014. 85p. Dissertação (M.S.) – UFSC.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos, 2000.

FRANCO, S.L. e BUENO, J.H.F. Otimização de Processo Extrativo de Própolis. **Informa**, v. 11, n.11-12. 1999.

GONZALEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo em vacas leiteiras**. Porto Alegre, UFRGS, 5-21p., 2001.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, 159-160p., 1990.

HOEPERS, C.A.; SILVA, B.T.; MARCUSSO, P.F.; COSENZA, G.R.; PORTO, E.P.; MATSUMOTO, L.S.; PEIXOTO, E.C.T.M. Utilização de própolis no controle de mastite bovina: desinfecção e selante de tetos. 38º Conbravet, Florianópolis, 2011. Disponível em: < > Acesso em: 17/05/2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal: 2014**. Rio de Janeiro, v. 42, 39p., 2014.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 6.ed., 661p., 1998.

JONES, G.M. 1998. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. Disponível em:<>. Acesso em: 04/06/2016.

JUNIOR, W.B.; MIRANDA, E.O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D.W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações de própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Ciências biológicas e da saúde**, v.33, n.1, 3-10p., 2012.

KLOSS, A.; BERDNARSKI, F.; OLIVEIRA, K.J.; OHI, M. Leite bovino. In: OHI, Masahiko; KNOPKI, Ana, Carolina Gurgel; BEDNARSKI, Franciela; NASCIMENTO, Lígia Valéria; SILVA, Lílian Barbosa. **Princípios Básicos para Produção de Leite Bovino**. Curitiba, 100-114p., 2010.

KONEMAN, E.W. ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; EINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi, 5. ed. 1465p., 2001.

LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M; LANGENEGGER, C.H. et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, 437-440p., 1970.

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

LANGONI, H.; PENACHIO, D.S.; CITADELLA, J.C.C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P.Y.; LUCHEIS, S.B.; MENOZZI, B.D.; SILVA, A.V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, 1059-1065p., 2011.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, 2013.

LIMA, M.C. Efeito de tratamentos térmicos do leite tipo C em grupos de micro-organismos e em seu desenvolvimento e estocagem em diferentes temperaturas. Viçosa, 1998. 90p. Dissertação (M.S.) – UFV.

LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.Da.; VARGAS, A.C.De. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, 2006.

LOPES, L.O.; LACERDA, M.S.; RONDA, J.B. Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.20, 2013.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L. C. C., RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

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

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, 529-536p., 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, 105–112p., 2001.

MELO, R.P.B.; MACHADO, A.C.; MOTA, A.R.; SILVA, J.G.; LIMA, D.C.V.; SILVA, L.B.G.; MOTA, R.A. Bactérias isoladas de amostras de leite de vacas leiteiras no estado de Pernambuco. **XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX**. Recife, 2013.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos e suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.72, n. 3, 405-411p., 2005.

MENEZES, M.F.C.; SIMEONI, C.P.; ETCHEPARE, M.A.; HUERTA, K.; BOROTOLUZZI, D.P.; MENEZES, C.R. Microbiota e conservação do leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.18, 76-89p., 2014.

MYLLYS, V.; RIDELL, J.; BJORKROTH, J.; BIESE, I.; PYORALA, S. Persistence in bovine mastitis of Staph. aureus clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Veterinary Microbiology**, v.51, 245-251p., 1997.

OLIVEIRA, M.M.N.F. Prevenção e controle da mastite em novilhas leiteiras. IN: **Novilhas Leiteiras**. PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.G.; QUEIROZ, A.C.; MIZUBUTI, I.Y. Fortaleza, Ed. Graphiti, 632p., 2010.

PARDO, P.E.; METTIFOGO, E.; MULLER, E.E.; NASCIMENTO, E.R.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; FREITAS, J.C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.3-4, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. H.; ALENCAR, S. M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical method and biological activity. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 58, 2-7p., 2000.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; WANG, H.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K. 2000. Determinação das Atividades Citotóxicas e Anti-HIV dos Extratos Etanólicos de Própolis Coletadas em Diferentes Regiões do Brasil. Disponível em: <>. Acesso em: 14/05/2016.

PEIXOTO, E.C.T.M.; JARDIM, J.G.; HEINZEN, E.L.; DOMINGUES, P.F.; PADOVANI, C.R.; ORSI, R.O. Própolis no controle da mastite bovina. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.4, 43-53p., 2012.

PELCZAR JR, Michel Joseph; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel, R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. São Paulo, v. 2, 2. ed., 517p., 1997.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano IX, n. 16, 2011.

PHILPOT, W.N.; NICKERSN, S.C. Mastitis: Counter Attack. Naperville: Babson Bros, 150p., 1991.

PINTO, M.S. Contagem bacteriana total do leite cru produzido nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais após implementação da Instrução Normativa nº. 51/2002. Niterói, 2008. Dissertação (M.S.) – UFF.

PRATA, L.F. **Fundamentos da Ciência do Leite**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2001.

QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R.C. Bovine protothecal mastitis: a review. Perspectives in Agriculture, **Veterinary Sciences**, Nutrition and Natural Resources, v.1, n.17, 1-7p., 2006.

REZENDE, G. P. S. R.; PIMENTA, F. C.; COSTA, L. R. R. S. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial própolis extracts. **Brazilien Journal Oral Science**, 967-970p., 2006.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, 21-29p., 2002.

SANTOS, M.V. **Redução da contagem bacteriana na propriedade. IV Congresso Brasileiro da Qualidade do Leite**. Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite. Florianópolis, SC, 2010.

SANTOS M.V.; FONSECA L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Barueri: Manole, 314p., 2007.

SCHALM, O.W. e NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.130, 199-204p., 1957.

SFORCIN, J. L.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1-2, 243-249p., 2000.

SILVA, P. H. F. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Química nova na escola**. São Paulo, n. 6, 3-5p., 1997.

SILVA, L.C.A.; PESSOA, D.A.N.; SILVA, L.S.A.; AQUINO, S.S.; MACÊDO, M.M.S.; MATTOS, R.A.T.; JÚNIOR, F.G. Avaliação *in vitro* da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.82, 1-4p., 2015.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, R. R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. n.57, 251-260 p., 2005.

TAKAHASHI, F. H.; CASSOLI, L. D.; ZAMPAR, A.; MACHADO, P. F. Variação e controle da qualidade do leite através do controle estatístico de processos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, n. 1, 99-107p., 2012.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**, v.60, n.3, 222-227p., 1994.

TOMAZI, T. Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus coagulase negativa*. Pirassununga, 2013. Dissertação (M.S.) – USP.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Garça: FAEF. Ano VI, n.10, 2008.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 168p., 2003.

USDA - United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Dairy: World Markets and Trade. Disponível em: < >. Acesso em: 14/04/16.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; DA COSTA, M.M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Revista Ciência Rural** 34, 159-163p., 2004.

WIELSE, H. **Novo Manual de Apicultura**. Guaíba - RS, 292p., 1995.

ZADOKS, R.N., ALLORE, H.G., HAGENAARS, T.J., BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H. A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* v.129, 397–416p., 2002.

ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.1, 56-65p., 2008.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência** – ACBS, v.1, n.1, 65-70p., 2010.