

NARA GEANNE DE ARAÚJO MEDEIROS

TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA COM PRÓPOLIS VERDE PRODUZIDA
NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2001

NARA GEANNE DE ARAÚJO MEDEIROS

TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA COM PRÓPOLIS VERDE PRODUZIDA
NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

APROVADA: 17 de dezembro de 2001.

Prof. Dejair Message
(Conselheiro)

Prof. Paulo Sérgio de A. Pinto
(Conselheiro)

Prof. José Antônio Viana

Prof.^a Paula Dias Bevilacqua

Prof. José Eurico de Faria
(Orientador)

Ao meu pai, Eronides Alves de Medeiros, grande homem, que sempre demonstrou com atos e palavras o sentido da honestidade, amizade e respeito pelo próximo. Você foi e sempre será meu exemplo de vida. Obrigado pelo seu amor e dedicação.

A minha mãe, Rosália Medeiros, por todo amor, dedicação e apoio sempre constante, em especial nesta etapa de minha vida.

A minha tia, Luzineide M. Soares, pelo seu carinho e exemplo de luta e perseverança.

Ao meu irmão, Allan, pelo seu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor e Luz de minha vida, pela saúde, força, sabedoria e conforto durante este curso de pós-graduação.

Aos animais, razão para a realização deste estudo.

Ao Professor José Eurico de Faria, por toda orientação, paciência e dedicação fundamentais para a conclusão deste curso de mestrado.

Ao professor Dejair Message, por sua co-orientação e idéias.

Ao Sr. Adomar Jesus de Carvalho pela doação da própolis necessária à realização do experimento.

Ao professor Paulo Sérgio de Arruda Pinto, por sua co-orientação, sugestões e ajuda nos momentos que necessitei.

Ao Departamento de Veterinária, que permitiu a conclusão deste curso.

Aos professores Paula Dias Bevilacqua e José Antônio Viana por terem participado gentilmente da banca examinadora e pelas sugestões oportunas e engrandecedoras para o trabalho.

À professora Rilene Ferreira Diniz Valadares, coordenadora do curso de pós-graduação, pelo o apoio e ajuda fundamental para a conclusão deste trabalho. Alguns atos ficam marcados para sempre na mente e no coração, e os seus para comigo serão sempre lembrados.

Ao professor Paulo Cecon, pela sua contribuição fundamental na análise estatística deste estudo.

Ao Marcelo Sousa Pinto, pela valiosa contribuição através dos seus conhecimentos, idéias e amizade, fundamentais para a realização do experimento de tese.

Ao Nivaldo Junqueira e sua família, pela amizade, ajuda e hospitalidade. Serei eternamente grata.

A todos os professores das disciplinas cursadas, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao funcionário Luiz Carlos da Silva pela ajuda fundamental ao término do experimento, incentivo e amizade.

A todos os funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Viçosa, pela amizade e ajuda prestada na preparação do material das análises.

À direção do estábulo da Universidade Federal de Viçosa, pela permissão para instalação do experimento neste local.

Ao produtor José Fajardo e sua família, que permitiram a instalação do experimento em sua propriedade e pela hospitalidade.

A Rose, secretária do curso de pós-graduação, por sua ajuda e dedicação ao trabalho.

Ao Cláudio Vieira pela ajuda na análise estatística do trabalho.

Ao meu tio José Soares e minha prima Isabela pelo apoio e carinho.

Aos amigos, Almir e Rosângela, meu muito obrigado pela amizade e apoio.

À minha grande amiga-irmã, Rosilene, pela amizade, apoio e conselhos.

Ao Eduardo José, pelo seu carinho, companheirismo e apoio.

As amigas Neuza, Keila e Nelzi. Guardarei vocês no meu coração.

Aos amigos de jornada: Daniele Barros, Ana Elisa, Carla, Paulo Martins, Emília, Jorge, Denise, Teresa, Leonardo.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão desta etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

NARA GEANNE DE ARAÚJO MEDEIROS, filha de Eronides Alves Medeiros e Rosália de Araújo Medeiros, nasceu em 18 de setembro de 1971, na cidade de Patos-Pb.

Graduou-se no curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba em 1995.

Foi bolsista de iniciação científica de agosto de 1993 a julho de 1994 pela Universidade Federal da Paraíba, realizando pesquisa na área de Medicina Veterinária Preventiva.

Obteve o título de especialista em Saúde Pública Animal pela Universidade Federal da Paraíba em 1998.

Foi professora substituta, no período de agosto de 1997 a março de 1999, das disciplinas Microbiologia Geral e Veterinária no Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal da Paraíba.

Ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em abril de 1999, submetendo-se a defesa de tese em dezembro de 2001.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Mastite	4
2.2. Própolis	11
2.2.1. Atividade antimicrobiana da própolis	13
2.2.2. Uso de própolis em mastite bovina	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Local de execução	21
3.2. Animais	21
3.2.1. Identificação dos animais com mastite	22
3.3. Colheita das amostras de leite	23
3.4. Análises realizadas	23
3.4.1. California Matitis Test	23
3.4.2. Contagem de células somáticas	24
3.4.3. Análises Microbiológicas	24

	Página
3.4.3.1. Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.4.3.2. Identificação de <i>Streptococcus</i> sp	25
3.4.3.3. Identificação de <i>Escherichia coli</i>	26
3.5. Origem da própolis	27
3.6. Preparo do extrato de própolis	27
3.7. Obtenção do extrato seco de própolis	27
3.8. Preparo da formulação com própolis	28
3.9. Tratamento dos animais	29
3.10. Análise estatística	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Atividade antimicrobiana da própolis no tratamento de mastite clínica	32
4.2. Atividade antimicrobiana da própolis no tratamento de mastite subclínica	39
4.3. Número de células somáticas (NCS) no leite de vacas com mastite clínica submetidas a tratamento com própolis	42
4.4. Número de células somáticas (NCS) no leite de vacas com mastite subclínica submetidas a tratamento com própolis	44
5. RESUMO E CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	56
ANEXO A	57
ANEXO B	60

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Relação de patógenos contagiosos e ambientais causadores de mastite bovina	5
2. Efeito da CCS no leite total do rebanho (leite de tanque) sobre a produção de leite (considerando-se a produção média de uma vaca sadia de 5.000 Kg/ano)	7
3. Resultados referentes à resistência <i>in vitro</i> dos principais agentes etiológicos isolados de casos de mastite em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo (SP) e do Estado de Minas Gerais (MG), frente a 12 antimicrobianos. Brasil, 1997	10
4. Características utilizadas para a identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
5. Diferenciação de Streptococcus causadores de Mastite Bovina	26

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Eficácia da formulação com própolis e influência do veículo (DMSO) no tratamento da mastite clínica e subclínica	33
2. Eficácia da formulação com própolis na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite clínica	35
3. Influência do veículo (DMSO) na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite clínica	39
4. Eficácia da formulação com própolis na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite subclínica	40
5. Influência do veículo (DMSO) na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite subclínica	42
6. Comparação do número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite clínica no início do tratamento com a diferença das médias obtidas 24, 48, 96 e 216h após a primeira aplicação da formulação com própolis ou veículo. (x 10 ⁶ células/mL leite)	43
7. Número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite clínica após o início do tratamento	43

8. Comparação do número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite subclínica no início do tratamento com a diferença das médias obtidas 24, 48, 96 e 216h após a primeira aplicação da formulação com própolis ou veículo. ($\times 10^{-5}$ células/mL leite)	45
9. Número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite subclínica após tratamento	46
1A. Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite clínica tratadas com formulação de própolis	57
2A. Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite clínica que receberam o veículo (DMSO)	58
3A. Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite subclínica tratadas com formulação de própolis	59
4A. Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite subclínica que receberam o veículo (DMSO)	59
1B. Análise de variância do número de células somáticas presentes no leite de vacas com Mastite Clínica em função da aplicação de Própolis e DMSO nos quatro períodos de coleta	60
2B. Análise de variância do número de células somáticas presentes no leite de vacas com Mastite Subclínica em função da aplicação de Própolis e DMSO nos quatro períodos de coleta	60

RESUMO

MEDEIROS, Nara Geanne de Araújo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2001. **Tratamento de mastite bovina com própolis verde produzida no Estado de Minas Gerais.** Orientador: José Eurico de Faria. Conselheiros: Dejour Message e Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Neste estudo foi testada a eficácia de uma formulação a base de própolis verde, especialmente sua fração etanólica, no tratamento da mastite clínica e subclínica. Foram utilizados 25 e 17 quartos mamários para a forma clínica e subclínica, respectivamente. Estes foram divididos em um grupo tratado com a formulação e outro que recebeu apenas o veículo, sendo avaliada a cura microbiológica e o número de células somáticas no leite. Foram tratados com a formulação de própolis 15 quartos mamários de animais que apresentavam mastite clínica, obtendo-se a cura de 11 quartos. Já os animais que receberam apenas o veículo, o número de cura foi de três dentre dez quartos tratados. Comparando-se estes dois valores, constatou-se que houve diferença significativa entre estes tratamentos ($p < 0,05$), sugerindo que a formulação exerceu atividade antimicrobiana nos casos estudados. Observou-se sensibilidade dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus* sp coagulase negativo, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, levedura e enterobactéria não classificada. O veículo (DMSO) pode ter exercido algum efeito positivo ou negativo sobre o mecanismo de ação da própolis na mastite clínica. Nos casos de mastite subclínica tratados com esta formulação a base de própolis, verificou-se dois quartos mamários

curados e oito não curados. No grupo de animais que receberam o veículo não foi constatada a cura de nenhum quarto mamário. Portanto, na mastite subclínica não houve diferença significativa entre os dois tratamentos ($p > 0,05$), ressaltando que o baixo número de amostras pode ter influenciado o resultado. O *Staphylococcus aureus* não demonstrou sensibilidade à formulação com própolis na mastite subclínica. Com relação ao número médio de células somáticas no leite dos animais com mastite clínica tratados com própolis, observou-se uma redução significativa destas células após o tratamento. Já nos casos de mastite subclínica ocorreu um aumento significativo das células somáticas após a primeira aplicação da formulação seguida por uma diminuição significativa no decorrer da terapia. Esses resultados do número de células somáticas sugerem que esta formulação teve ação antiinflamatória nas duas formas de mastite.

ABSTRACT

MEDEIROS, Nara Geanne de Araújo, Master of Science, Universidade Federal de Viçosa, Dezember 2001. **Bovine mastitis treatment with green propolis produced in the State of Minas Gerais.** Advisor: José Eurico de Faria. Committee members: Dejair Message and Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

In this study, a formula based on green propolis, especially its ethanolic fraction, has been tested for clinic and subclinic mastitis treatment. 25 and 17 mammary quarters were used for clinic and subclinical treatments, respectively. These were separated in one group, treated with the formulation and another which only received the vehicle, under evaluation of the microbiological cure and the number of somatic cells in the milk. Animals with clinic mastitis in 15 mammary quarters were treated with the propolis formula, achieving cure in 11 quarters. Among the animals that received the vehicle only, cure was the obtained in three of ten treated quarters. Comparison revealed a significant difference between these treatments ($p < 0.05$), indicating that the formulation had exerted an antimicrobial activity in the studied cases. Sensitivity of the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus* sp negative coagulase, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, yeast and unclassified enterobacteria was observed. The vehicle (DMSO) may have had a positive or negative effect on the mechanism action of propolis in clinic mastitis. In the cases of subclinical mastitis treated with this propolis-based formulation, four mammary quarters were cured, while eight remained uncured. Among the animal group which had received the vehicle, cure was not observed in any of the mammary quarters. However, there was no significant difference between the two treatments ($p > 0.05$) for subclinical mastitis, but we point out, that the low sample number may have influenced this result.

Staphylococcus aureus was not sensitive to the propolis formula in subclinical mastitis. After the treatment, a significant reduction in the average number of somatic cells in the milk of those animals with clinic mastitis that had been treated with propolis was stated. On the other hand, there was a significant increase of somatic cells for the cases of subclinical mastitis after the first formulation application, followed by a significant decrease during the therapy continuation. These results of somatic cell numbers indicate that this formulation had anti-inflammatory action in both mastitis forms.

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, muito freqüente em bovinos. É a doença que provoca mais prejuízos econômicos no rebanho leiteiro, onde aproximadamente 40% das vacas são infectadas. Esta enfermidade, quando clínica ocasiona danos significativos e apreciáveis, resultantes de leite descartado, custo do tratamento, reposição de animais não produtivos, dentre outros. No entanto, a mais importante perda isolada atribuível a esta doença é a queda na produção de leite associada a infecções subclínicas, que na maioria das vezes não são percebidas, pois os animais não apresentam sinais clínicos e o leite encontra-se com aspecto normal (Hogan & Smith, 1997).

Sendo o leite o alimento mais completo para o ser humano, deve fazer parte da dieta, em especial de crianças, idosos e convalescentes (Germano & Germano, 1995). Logo, é necessário que o mesmo apresente condições higiênicas e sanitárias adequadas, e que seja livre de contaminação de qualquer espécie (Cova, 1984), portanto isento de resíduos de antibióticos.

A ampla utilização de antibióticos na pecuária tem contribuído para o controle de várias enfermidades dos animais domésticos, dentre elas as infecciosas e zoonoses. Entretanto, inúmeras vezes isto leva à ocorrência de resíduos destes medicamentos no leite, e uma das principais causas é o tratamento de bovinos com mastite, principalmente a infecciosa. Isto tem sido um dos maiores obstáculos à indústria de alimentos no mundo, pois interfere na fabricação de alguns produtos lácteos fermentados e traz graves riscos à saúde pública, tais como: resistência a vários tipos de antibióticos,

hipersensibilidade, distúrbios da flora intestinal, discrasias sangüíneas, efeitos teratogênicos e alterações no desenvolvimento ósseo fetal, dentre outros.

O tratamento medicamentoso ideal para a mastite seria aquele que pudesse controlar todos os processos infecciosos do úbere sem deixar resíduos no leite (Costa, 1999). No entanto, estudos em vacas com mastite mostraram grande variação no tempo de eliminação dos antibióticos no leite. Independente da droga e da via de inoculação, a permanência de antibiótico no leite tem ultrapassado em muito o tempo previsto e permitido pela legislação brasileira (Fagundes, 1980).

Não se pode deixar de relatar a importância da resistência dos principais agentes etiológicos da mastite bovina aos antibióticos rotineiramente usados no seu tratamento. Os *Staphylococcus*, principalmente o *Staphylococcus aureus*, são conhecidos por apresentarem grande resistência aos tratamentos convencionais, o que mostra a importância de novas pesquisas sobre o controle da infecção estafilocócica na glândula mamária (Faria, 1995).

Os produtos apícolas, a cada dia ganham mais espaço na terapia de várias doenças, com o objetivo de alcançar maior eficiência, menor toxicidade e menores efeitos colaterais. Muitos países europeus estão interessados em produtos naturais para a cura de doenças, e a própolis é um importante produto usado para este propósito (Marcucci, 1995).

Outro fato de relevante importância é o crescente desenvolvimento da apicultura no Brasil, apresentando uma grande disponibilidade de própolis, sendo mais comercializada para o Japão e países asiáticos.

A própolis apresenta-se como uma alternativa natural de tratamento das mastites infecciosas, uma vez que muitos trabalhos científicos *in vitro* mostram as diferentes atividades biológicas deste apiterápico, dentre elas a antibacteriana como mostra o estudo de Pinto (2000). Sua utilização poderia diminuir os custos do tratamento das mastites, os resíduos de antibióticos no leite e, de uma forma geral, as perdas econômicas ocasionadas por esta enfermidade.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia da própolis verde, especialmente de sua fração etanólica, no tratamento de mastite bovina

clínica ou subclínica, bem como avaliar seus efeitos sobre o número de células somáticas no leite dos animais tratados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite

O termo mastite tem sua origem no idioma grego: *mastos* que significa “mama”, e *itis*, que significa “inflamação”. Portanto, mastite é a inflamação da glândula mamária, podendo ser causada por agentes físicos, químicos ou infecciosos, sendo a maioria dos casos de origem infecciosa e geralmente causada por bactérias (Quinn et al., 1994).

Os agentes etiológicos isolados com mais frequência em amostras de leite de vacas com mastite são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp e membros da família *Enterobacteriaceae* (Quinn et al., 1994). Segundo Corrêa & Corrêa (1992), 80 a 90% das mastites infecciosas são ocasionadas por estes microrganismos. As leveduras e algas ocasionalmente causam infecção intramamária. Já os vírus, raramente são fontes primárias deste tipo de infecção (National Mastitis Council, 1998). Traumas ou agentes químicos irritantes, sem a presença de microrganismos, são causas consideradas raras (National Mastitis Council, 1998).

A mastite pode ser subdividida com base na origem do agente infeccioso, em contagiosa e ambiental. A contagiosa ocorre quando as bactérias são transferidas da glândula mamária de vacas infectadas para outras sadias, através do equipamento de ordenha contaminado, pelo bezerro ao mamar ou pelas mãos dos ordenhadores. A ambiental ocorre quando bactérias com fonte de infecção distintos da glândula mamária têm acesso a esta por meio do esfíncter da teta, causando a moléstia. As bactérias

coliformes são as mais representativas desta categoria de patógenos na mastite (Smith, 1994). Com isso, os microrganismos envolvidos nesta enfermidade dividem-se em dois grupos: contagiosos e ambientais (Quadro 1).

Quadro 1 – Relação de patógenos contagiosos e ambientais causadores de mastite bovina

Patógenos contagiosos	Patógenos ambientais
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Citrobacter</i> spp.
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase (-)	<i>Enterobacter</i> spp.
	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	<i>Streptococcus equinus</i>
	Outros <i>Streptococcus</i>
	(<i>Streptococcus</i> spp)
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: National Mastitis Council, 1998.

A mastite subclínica ocorre quando a glândula mamária está infectada e o número de leucócitos (células somáticas) está aumentado, acima de 500.000 células/mL (National Mastitis Council, 1998). Este aumento é influenciado principalmente pelo estado infeccioso (Harmon, 1994), mas outros fatores como fase de lactação, idade do animal, estação do ano e vários tipos de estresse podem influenciar a contagem de células somáticas (CCS), tendo pouca importância se não ocorre infecção concomitante da glândula mamária (Reneau, 1986, Harmon, 1994). O leite tem aspecto macroscópico normal e não há sintomas visíveis de inflamação do úbere, estando comumente associada a *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (Smith, 1994).

Já a mastite clínica se caracteriza por leite visivelmente anormal e pela evidência de graus variados de inflamação do úbere (rubor, calor, tumefação e dor)

(Smith, 1994). Quando a mastite clínica é mediana, as anormalidades estão restritas às mudanças no aspecto do leite, enquanto a forma hiperaguda da doença é caracterizada por uma severa sintomatologia sistêmica (Radostits et al., 1994; National Mastitis Council, 1998).

Em uma outra forma de mastite, a crônica, é observada persistência e recorrência das mudanças presentes no leite por longos períodos. Ocasionalmente, casos crônicos podem evoluir para uma forma mais ativa da doença (Radostits et al., 1994).

No caso de infecção das glândulas mamárias, a defesa ocorre por imunidade natural através de barreiras físicas e reações celulares, e por imunidade artificialmente adquirida, por exemplo, através de vacinas (Homan & Waltiaux, 1996). O acúmulo local de células do sistema imunológico e o aumento de CD8+ próximo ao epitélio sugere um papel da defesa imune local (Salmon, 1987; Chabeaudie et al., 1993). Com relação às células presentes no leite, existem células epiteliais, fragmentos de hemácias, granulócitos, representados por neutrófilos e eosinófilos, linfócitos e macrófagos (Schollenberger et al., 1986).

Assim, um importante fator para a secreção láctea é a saúde do animal. Estando o organismo doente, diminui a sua produção de leite (Kolb, 1987). Essa redução é um dos sintomas mais evidentes da mastite e depende do grau de inflamação. Segundo Korhonen & Kaartien (1995), esta pode ser estimada a partir da contagem de células somáticas (CCS) no leite (Quadro 2). Sempre que a CCS ultrapassa 100.000/ mL, a produção é reduzida (Brito & Brito, 1998).

A reação inflamatória altera a composição do leite tanto em termos de quantidade quanto de qualidade. À medida que o grau de inflamação aumenta, diminui a síntese de leite e a composição química tende a se aproximar daquela do sangue, porque os componentes são transferidos da circulação sangüínea para a glândula mamária (Brito & Brito, 1998).

Quadro 2 – Efeito da CCS no leite total do rebanho (leite de tanque) sobre a produção de leite (considerando-se a produção média de uma vaca sadia de 5.000 Kg/ano)

CCS no leite de tanque (x 1.000/mL)	Redução na produção (Kg/vaca/ano)	Redução na produção (%)
< 250	—	--
250 – 500	200	4
500 – 750	350	7
750 – 1.000	750	15
> 1.000	1.000	18

Fonte: Korhonen & Kaartien (1995).

Paralelamente à redução na produção de leite, ocorre diminuição de 5 a 15% do conteúdo de matéria seca, menos de 10% no teor de gordura e cerca de 10% da quantidade de lactose. A quantidade total de proteínas não diminui claramente até a CCS exceder 1.000.000/mL. As mudanças que ocorrem com os minerais têm influência no processamento e na redução do valor nutritivo do leite. As vitaminas do complexo B e vitamina C sofrem grandes reduções (Brito & Brito, 1998).

A mastite geralmente contribui para o aumento da atividade enzimática e bioquímica no leite. Algumas dessas características têm sido usadas como recurso diagnóstico dessa doença como a pesquisa de catalase e NAGase (Brito & Brito, 1998). De uma forma geral, as alterações que a mastite ocasiona nos componentes e características do leite interferem com a qualidade final dos produtos industrializados e reduz suas propriedades nutritivas (Brito & Brito, 1998).

Todas as fêmeas de mamíferos são susceptíveis a esta enfermidade. Ocorre durante todo o ano e em todos os países e regiões, quase que exclusivamente durante a lactação. A incidência da mastite é variável de acordo com o tipo de criação, higiene e fatores predisponentes como: grande produção de leite, traumas mamários (pastos sujos, maus tratos, cabeçadas de lactentes), o tipo e método de ordenha (Corrêa & Corrêa, 1992).

O *Staphylococcus aureus* é um agente causal de mastite no rebanho leiteiro, podendo ser encontrado no leite, onde níveis elevados de contaminação podem ser rapidamente alcançados se as condições para a sua multiplicação são favoráveis. Durante seu crescimento no leite, cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas estão aptas a produzir enterotoxinas termoestáveis, que quando ingeridas pelo homem causam náusea, vômito e diarreia (Silva, 2000).

Segundo estudo realizado por Larsen et al. (2000) algumas cepas de *Staphylococcus aureus* são mais contagiosas, virulentas ou persistentes que outras. O reservatório humano deste agente não representa papel preponderante como fonte de infecção intramamária bovina.

Resultados de trabalho realizado com *Escherichia coli* presente no leite e nas fezes de vacas com mastite, e nas fezes de vacas saudáveis com respeito às propriedades bioquímicas e a certos fatores de virulência potenciais, mostraram não haver diferença significativa entre estes grupos. Os dados são consistentes com a hipótese de que a *Escherichia coli* da mastite é simplesmente um patógeno oportunista (Nemeth, 1994).

A mastite causada por patógenos ambientais é um dos principais problemas que afetam rebanhos leiteiros de alta produtividade. Entre os patógenos ambientais, o *Streptococcus dysgalactiae* é freqüentemente isolado de infecções intramamárias durante a lactação e período seco. Sobrevivem em células epiteliais mamárias por períodos extensos de tempo, sem perder a viabilidade ou capacidade de danificar a célula eucariota (Calvinho et al., 1999).

A mastite clínica em vacas é rotineiramente tratada, em muitos países, com infusões intramamárias, as quais possuem em sua formulação algum tipo de antibiótico. No entanto, a eficácia clínica de um antibiótico é muito difícil de ser quantificada, pois a reinfecção é comumente confundida como falha do tratamento (National Mastitis Council, 1998).

Outro fato de relevante importância é a existência de grandes variações na resposta a um tratamento para mastite, tanto de vaca para vaca como entre rebanhos. Estas variações são devidas ao tipo de bactéria envolvida, localização dos sítios infectados na glândula mamária, severidade da tumefação da glândula, cronicidade da infecção e a outros fatores (National Mastitis Council, 1998).

Na mastite aguda, quando a glândula está edemaciada e os ductos lactóforos estão ocluídos por secreções anormais, muitas drogas são fracamente absorvidas e podem não penetrar completamente na glândula mamária. Isto pode afetar os resultados do tratamento, principalmente em infecções extensas como aquelas causadas por *Staphylococcus* sp (Pyörälä & Pyörälä, 1998).

O uso de antibióticos durante a lactação pode diminuir ou eliminar a maioria dos sintomas clínicos da mastite, mas a cura microbiológica é pequena, principalmente quando o agente etiológico é o *Staphylococcus aureus* (Radostits et al., 1994; Waage et al., 1999). Isto se deve às lesões que este microrganismo provoca no organismo animal, levando o sistema imunológico a criar um isolamento da área afetada, através dos leucócitos e tecido conjuntivo fibroso, formando abscessos e perda de função da parte lesada. Periodicamente, a bactéria pode romper esta barreira e infectar tecidos saudáveis adjacentes, iniciando novamente o ciclo de infecção (Wattiaux, 1996; National Mastitis Council, 1998).

Na atualidade, apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para o tratamento da mastite, o problema da resistência dos microrganismos a estes medicamentos vem aumentando devido ao uso indiscriminado e incorreto, sobretudo no Brasil (Costa, 1999).

A mastite é a doença que causa mais prejuízos econômicos no rebanho leiteiro, principalmente quando não se dispõe de um programa de controle efetivo. Estas perdas são ocasionadas por: diminuição na produção de leite, custo de tratamento, leite descartado, descarte precoce dos animais doentes (ocasionando atraso no avanço genético do rebanho) e redução na qualidade do leite (Hogan & Smith, 1997).

Segundo cálculos realizados nos Estados Unidos, as perdas econômicas causadas pela mastite variam de 200 a 300 dólares por vaca ao ano. Os prejuízos totais estão, anualmente, próximos de 1,5 a 3,0 bilhões de dólares. No estado da Geórgia, nos Estados Unidos, estima-se perda de 20 a 40 mil dólares por rebanho todos os anos, resultando em perda de mais de 20 milhões de dólares para a sua indústria de leite (Hogan & Smith, 1997).

Dentre os microrganismos, o *Staphylococcus aureus* produz danos mais sérios nos tecidos da glândula mamária que o *Streptococcus agalactiae*, e as perdas econômicas com a diminuição da produção de leite estão em torno de 45% por quarto e 15% por vaca infectada (Hogan & Smith, 1997).

Quadro 3 – Resultados referentes à resistência *in vitro* dos principais agentes etiológicos isolados de casos de mastite em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo (SP) e do Estado de Minas Gerais (MG), frente a 12 antimicrobianos. Brasil, 1997.

Princípio ativo	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
	sp 2840 cepas (% resistência)	sp 1419 cepas (% resistência)	sp 3744 cepas (% resistência)
Penicilina	96,86	96,10	95,31
Ampicilina	95,17	92,35	89,42
Oxacilina	59,60	81,96	91,76
Tetraciclina	54,60	63,75	24,00
Lincomicina	47,67	60,59	32,88
Eritromicina	40,62	39,38	16,36
Amicacina	25,62	73,26	29,86
Cloranfenicol	24,63	18,15	9,51
Vancomicina	17,46	12,85	2,86
Sulfazotrin	16,22	59,88	40,86
Gentamicina	13,48	38,29	16,19
Cefalotina	9,67	27,69	13,24

Fonte: Costa, 1999.

Graaf & Dwinger (1996) relataram que as perdas na produção de leite em vacas com mastite subclínica, na Costa Rica, foram estimadas em 1,56 Kg de leite ao dia, por vaca. As perdas nesta produção por quarto mamário afetado foram em média 17,6%.

Outro ponto importante com relação às perdas econômicas é a proibição da comercialização de leite e derivados contendo resíduos de antibióticos e outros componentes bacteriostáticos, uma vez que interferem na fabricação de alguns produtos lácteos e trazem riscos à saúde da população que os consome (Bishop et al., 1984; Johnsson, 1993). Isto leva à diminuição na qualidade do leite e derivados, o que não se concebe atualmente, pois um bom padrão de qualidade é cada vez mais exigido pelos consumidores.

Medidas de controle são o principal e mais econômico meio para a eliminação da mastite bovina em um rebanho, no entanto, as dificuldades de implantação e manutenção destes procedimentos levam à necessidade de tratamento dos animais doentes, geralmente realizado através de antibioticoterapia, ocasionando inúmeras consequências para o animal, o leite e os consumidores como já mencionado anteriormente. Baseando-se neste fato surge a necessidade de encontrar terapias alternativas, como o uso de própolis.

2.2. Própolis

O termo própolis é originado do grego “pro” que significa defesa e “polis”, que significa cidade, portanto esta substância se constitui em uma barreira para vedar as fendas da colméia e impedir o ataque de invasores, especialmente os micróbios. A própolis, conhecida como “cola das abelhas”, é uma mistura de gomas, resinas, bálsamos, de viscosidade consistente, sabor amargo, cor variando do esverdeado claro ao pardo escuro (Cizmarik et al., 1975).

Os precursores da própolis são colhidos pelas abelhas de brotos, casca de árvores e de outras partes do tecido vegetal, que são transportados até a colméia, onde as abelhas adicionam e modificam sua composição através de secreções próprias como a cera e secreções salivares essenciais (Cizmarik et al., 1975).

O uso de própolis pelo homem é muito antigo, desde o Egito Antigo era empregada pelos sacerdotes que dominavam a medicina, a química e a arte de mumificação de cadáveres (Makashvili, 1975). No entanto, só recentemente passou a receber grande atenção da ciência, em especial nos países do antigo bloco socialista europeu. No Brasil, os estudos a respeito da própolis começaram entre o final da década de 70 e começo dos anos 80.

Dentre os produtos apícolas, como mel e geléia real, a própolis vem se destacando pelas suas propriedades terapêuticas: atividades antimicrobianas, antiinflamatórias, cicatrizantes, anestésicas, anticariogênica e anticancerígena. Possui outras ações como antiprotozoária, antitripanocida e citotóxica *in vitro* (Marcucci, 1994).

A própolis é composta em média por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (Iorish, 1975; Nikolaev, 1975; Grange & Davey, 1990). Estudos revelaram que a composição química é complexa, contendo mais de 160 componentes (Walker & Crane, 1987; Bonvehi et al., 1994; Marcucci, 1995; Bankova et al., 1998; Seixas et al., 2000; Soares et al., 2000), variando em função da flora disponível para a colméia e sua origem geográfica, concentração relativa de seus constituintes, período de coleta e variedades de abelhas *Apis mellifera* (Sousa & Bastos, 1999).

Vários compostos, principalmente polifenóis, já foram identificados em amostras de própolis e destes, os principais são os flavonóides aglicônicos, seguidos por ácidos fenólicos e seus ésteres (Greenaway et al., 1993; Bankova et al., 1992 *apud* Marcucci et al., 1994; Pereira et al., 1999). Também já foram encontrados outros elementos como as vitaminas B1, B2, B6, C, E, manganês, ferro, cálcio, alumínio, aminoácidos e polissacarídeos (Greenaway et al., 1990; Marcucci, 1994; Marcucci, 1995).

A pinocembrina, galangina, acacetina, apigenina, quercetina, rutina, rhamnetina, chrisina e vanilina são os flavonóides mais encontrados e estudados (Bankova et al., 1982; Bonhevi et al., 1994; Mattos et al., 1999).

Estudos mostraram que componentes individuais da própolis como os flavonóides são responsáveis pelas atividades espasmolítica, antiinflamatória, antiulcerativa ou antimicrobiana (Fernandes Jr. et al., 1995).

Existem relatos de que a substância ativa deste apiterápico é termicamente estável, conservando sua ação antibacteriana mesmo após ser submetida à temperatura de 100°C por meia hora (Prado Filho et al., 1962).

Podem ocorrer reações alérgicas à própolis, mas ela é relativamente atóxica (Santos et al., 1999). Uma possível reação pode ser uma resposta de hipersensibilidade, mas seu mecanismo não está totalmente elucidado (Paulino, 1999). Segundo estudo de Burdock (1998), não foi observado nenhuma reação alérgica em 90 camundongos que receberam própolis na dose de 1400 mg/kg ao dia.

2.2.1. Atividade antimicrobiana da própolis

Como citado anteriormente, a própolis exerce várias atividades no organismo, dentre elas pode-se destacar a antimicrobiana, atuando sobre vários microrganismos.

O comportamento do microrganismo frente à ação antimicrobiana da própolis tem sido investigado, mas a literatura é escassa a respeito dos seus efeitos sobre a resposta imune e variáveis bioquímicas, bem como sobre a sazonalidade de produção na atividade deste apiterápico (Sforcin, 1999).

De acordo com Levy (1999), a atividade da própolis vem sendo comprovada contra um número cada vez maior de microrganismos e seu mecanismo de ação é complexo, não podendo ser feita uma simples analogia com a ação de alguns antibióticos clássicos. Também relatam que no mecanismo de ação da própolis está envolvida a desorganização do citoplasma, da membrana plasmática e da parede celular, causando bacteriólise parcial, impedindo a síntese protéica e divisão celular.

A própolis também influencia a motilidade da bactéria, sendo a inibição, dose-dependente. As bactérias tornaram-se rapidamente imóveis na presença de 50 µg/mL de própolis, sendo o ácido cafeico feniletil éster o mais potente inibidor da motilidade, porém seu efeito foi reversível, provavelmente por inativação ou detoxificação deste composto. Portanto, esta ação dos componentes da própolis pode ter importante função na inibição da patogênese bacteriana e no desenvolvimento de infecções, pois a motilidade e quimiotaxia são importantes fatores de virulência usados pelas bactérias para alcançar os sítios de aderência e invadir o hospedeiro (Mirzoeva et al., 1997).

Takaisi-kikuni & Schilcher (1994) observaram que o extrato etanólico de própolis (EEP) inibia o crescimento de *Streptococcus agalactiae* por prevenir a divisão celular, ocasionando a formação de *Streptococcus* pseudomulticelulares (policarióticos), presença de espaços vazios ou estruturas fibrosas (fibrous-like) no citoplasma, alteração na membrana citoplasmática, defeitos na estrutura da parede celular, levando a bacteriólise parcial. Ainda constataram que o EEP inibia a síntese protéica.

De acordo com Bankova et al. (1982), a atividade antimicrobiana da própolis deve-se aos flavonóides pinocembrina e galangina, sendo confirmada

pelo estudo de Fernandes Jr. et al. (1995). Esta ação também é atribuída ao ácido benzóico e ferúlico (Donadieu, 1980).

Segundo Mirzoeva et al. (1997), o efeito bactericida do extrato etanólico de própolis é causado pela presença de muitos ingredientes ativos e lábeis. Esta atividade foi espécie dependente, sendo mais efetivo contra bactérias Gram positivas e algumas Gram negativas.

Kujumgiev et al. (1999) afirmaram que amostras de própolis de diferentes origens geográficas, que foram investigadas quanto à sua atividade antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) e antiviral (contra vírus da influenza aviária) mostraram-se ativas contra o fungo e bactérias Gram positivas, demonstrando o máximo de atividade antiviral. Nas amostras provenientes da zona temperada, os flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos são conhecidos por serem responsáveis pelas atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral, já as amostras oriundas de zonas tropicais não contêm as mesmas substâncias, mas demonstraram estas mesmas atividades. Diferentes amostras e combinações de substâncias são essenciais para o efeito biológico da própolis.

Estudando o sinergismo de misturas de extrato de própolis e de alguns dos seus constituintes na capacidade de inibir o crescimento de uma amostra de *Staphylococcus aureus*, Kujumgiev et al. (1993) observaram um fraco sinergismo entre própolis e cafeato de benzila (12%), própolis e cafeato de isopentila (20%), pinocembrina e cafeato de benzila (12%) levando à conclusão de que a atividade antimicrobiana da própolis não depende significativamente do sinergismo dos seus constituintes.

Chmielewska et al. (1991), classificando 129 amostras de própolis em três categorias diferentes quanto ao nível de atividade bactericida frente a uma amostra de *Bacillus subtilis*, observaram que a própolis foi considerada como de alta atividade quando destruía todas as bactérias em meio de cultura numa concentração de 60-200µg/mL, média atividade em torno de 200 - 600µg/mL e de baixa atividade quando era requerida concentração maior que 600µg/mL. Em um mesmo apiário, a própolis coletada numa mesma época do ano, mas de colônias diferentes pode mostrar diferentes atividades. A comparação da atividade e o tamanho da colônia produtora mostrou que tanto as colônias grandes quanto as pequenas podem produzir própolis de alta ou baixa

atividade, não havendo então uma relação entre estes dois fatores. Também não foi observada relação entre a propriedade antibacteriana da própolis e nível de impureza. A atividade de uma própolis produzida por uma mesma colônia mantém-se estável por toda estação de produção (primavera, verão e outono). As amostras que possuíam alta atividade foram principalmente aquelas de colônias tidas como de alta produção, no entanto própolis altamente ativa foi encontrada em colônias pobres produtoras de própolis, apesar de em menor frequência.

Vários extratos alcoólicos de própolis foram testados contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* β . Os resultados variaram com o método de extração, porém independente da concentração de álcool utilizada (Obregon & Rojas, 1990).

Brumfitt et al. (1990) encontraram comportamentos distintos na atividade antibacteriana de extratos de própolis extraídos por diferentes solventes (água, soluções tampão pH 5, 6, 7 e 8, etanol, acetona, dimetilsulfóxido, clorofórmio e éter). Nenhum dos extratos exibiu alguma atividade sobre as espécies Gram negativas testadas, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os extratos produzidos a partir da água, soluções tampão pH 5 e 6 não mostraram atividade sobre as amostras de *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* testadas. Estes últimos foram inibidos pelos extratos obtidos através dos solventes: soluções tampão de pH 7 e 8, etanol, dimetilsulfóxido, clorofórmio e acetona, cujos diâmetros dos halos de inibição variaram de 7 a 14 milímetros (o diâmetro do disco de papel de filtro foi de seis milímetros). Todos os extratos estavam numa concentração de 100 mg de própolis por 1mL de solvente. Os extratos obtidos pelo uso de solventes orgânicos e não aquosos, mostraram ainda a capacidade de inibir o crescimento de amostras, isoladas de casos clínicos, de *S. aureus* (halos de 13 mm de diâmetro), *S. epidermidis* e dez amostras de *Clostridium* spp. (halos de 12 a 13 mm de diâmetro). Os *Streptococcus* dos grupos A e C e o *Corynebacterium xerosis* não foram afetados. Não foi encontrada nenhuma atividade antimicrobiana sobre qualquer espécie quando o teste foi realizado em meio ágar sangue.

Segundo Mirzoeva et al. (1997), as culturas de *Bacillus subtilis* de 6 horas de incubação mostraram ser mais sensíveis que aquelas de 18 horas (overnight), em estufa. As concentrações de própolis que inibiram 50% das

culturas de *B. subtilis* e *E. coli* foram, respectivamente, 200µg/mL e 450µg/mL. Em concentrações menores que 200µg/mL, a própolis causou uma imediata inibição da divisão celular, no entanto as células retomaram o crescimento após a fase Lag, na mesma taxa que as células controle. O período Lag aumentou em 3 e 7 horas, respectivamente, com o aumento da concentração de própolis em 50µg/mL e 100µg/mL, quando comparado ao período Lag de células não tratadas. Sob concentrações maiores que 200µg/mL, a inibição do crescimento foi irreversível. A própolis parece possuir efeito bactericida maior que o bacteriostático, pois a adição de 100µg/mL de própolis em suspensões de *B. subtilis* destruiu as células rapidamente. Após 15 minutos de incubação não foram observadas células viáveis. Assim, o prolongado período Lag nas curvas de crescimento na presença de concentrações baixas de própolis pode ser explicado pelo efeito bactericida sobre a maioria das células, sobrevivência e conseqüente crescimento das células remanescentes. Os autores ainda sugeriram que a retomada do crescimento bacteriano sob concentrações baixas de própolis pode também ser explicada por mecanismos como: detoxificação latente, seleção de formas resistentes ou detoxificação espontânea de componentes ativos da própolis.

Langoni et al. (1994), estudando a eficiência antimicrobiana de extrato alcoólico de própolis, *in vitro*, proveniente de apiários em Botucatu - SP, observaram que houve 100% de inibição do crescimento de estirpes de *S. aureus* e *Corynebacterium bovis*, 90% de *Streptococcus agalactiae* e 91% de *E. coli*.

Vargas et al. (1994) observaram que a própolis possui excelente ação *in vitro* sobre gêneros bacterianos gram positivos isolados de mastite bovina, sugerindo que o produto possa ter grande validade como terapia alternativa para infecções causadas por estes microrganismos. Também foi verificada a ação *in vitro* da própolis sobre espécies bastante resistentes aos antimicrobianos comuns, concluindo que o prosseguimento de pesquisas que explorem o combate *in vivo* destas infecções deve continuar.

De acordo com Barizon et al. (1999), a própolis em solução alcoólica exerceu alta atividade contra bactérias gram positivas e considerável ação

contra gram negativas e fungos em forma de leveduras. O mel enriquecido com própolis teve sua atividade potencializada contra bactérias gram positivas.

Os extratos alcoólicos de própolis verde produzidos pela *Apis mellifera* e coletados de apiários de cerrado do Estado de Minas Gerais foram utilizados para determinar a atividade antibacteriana e concentrações inibitórias mínima, sendo comparados com 29 antibióticos comumente utilizados. Cepas de bactérias gram positivas e gram negativas tais como, *Listeria monocitogenes*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Shigella flexneri* sorovar 1, isolados de seres humanos foram testadas. Não foi mostrada nenhuma atividade antibacteriana da própolis contra cepas gram negativas, mas foi observada contra todas as gram positivas (Pereira, 1999).

Goulart et al. (1995) realizaram um estudo onde avaliaram “*in vitro*” a atividade do extrato etanólico de própolis em diferentes diluições, utilizando várias linhagens bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*). Chegaram à conclusão que a própolis apresenta atividade antibacteriana variável, dependendo da espécie e da amostra bacteriana, mostrando-se como uma opção terapêutica alternativa para controle de enfermidades infecciosas causadas por estas bactérias.

Hoffmann et al. (1998) estudando a atividade antimicrobiana *in vitro* de três produtos farmacêuticos à base de própolis (extrato, solução e spray de própolis) em três concentrações diferentes (10, 1 e 0,1%), verificaram que a própolis em forma de extrato a 10% inibiu o crescimento de 100% das bactérias e de 44% das espécies de levedura. Já a própolis em solução, nas três diferentes concentrações, mostrou-se ineficaz em inibir os microrganismos testados.

Estudos mostram que existe sinergismo entre extratos de própolis e alguns antibióticos de uso comum. Experimento, onde amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, quando testadas frente a uma mistura de própolis e antibiótico comum, foram sensíveis a uma concentração inibitória mínima (MIC) menor que a verificada só com antibiótico, em 70% dos testes (Kedzia & Holderna, 1986).

Krol et al. (1993), ao estudarem o sinergismo da própolis com oito tipos de antibióticos: penicilina G, doxiciclina, estreptomicina, cloxacilina,

cloranfenicol, cefradina, ampicilina e polimixina B, verificaram um efeito sinérgico significativo apenas em concentração de 600 µg/mL de própolis. No entanto, a ampicilina demonstrou antagonismo em relação ao extrato de própolis, isso pode ter sido devido a alguma interação química entre este derivado semi-sintético da penicilina com um componente fenólico da própolis, que pode ter reduzido o nível de ampicilina ativa no meio de cultura.

É sugerido que a combinação de extratos de própolis com antimicrobianos possa permitir a redução da dose clínica de determinados antibióticos, diminuindo a incidência de efeitos colaterais e ao mesmo tempo potencializando a antibioticoterapia no tratamento de infecções onde a resistência bacteriana torna-se fator determinante (Mirzoeva et al., 1997).

Koo et al. (1999) trabalharam com extrato etanólico de própolis a 10%, obtido de 200 amostras de própolis bruta de *Apis mellifera* e com diversos microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* NTCC 3736, *Candida albicans* F72, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Streptococcus mutans* OMZ – 175, *Streptococcus cricetus* HS-6, *Actinomyces naeslundii* W1053, *Actinomyces viscosus* OMZ 105, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas denticola* e *Escherichia coli*. Chegaram à conclusão que os microrganismos testados demonstraram ser susceptíveis a este apiterápico com exceção da bactéria *Escherichia coli*, e que a própolis tem propriedades antimicrobianas sobre os patógenos bucais, porém sua atividade biológica foi bastante variável dependendo da região de coleta.

Meresta & Meresta (1985) examinaram a sensibilidade de 75 cepas bacterianas ao extrato de própolis, dessas, 69 foram identificadas como *Staphylococcus* spp ou *Streptococcus* spp. Todas as cepas exibiram uma elevada sensibilidade para este apiterápico.

Com relação à atividade da própolis sobre *Actinobacillus actinomycetecomitans*, todas as amostras foram consideradas susceptíveis, independentes da origem do extrato alcoólico da própolis utilizado e da época de coleta (Santos et al., 1999).

2.2.2. Uso de própolis em mastite bovina

O primeiro relato da utilização de própolis no tratamento da mastite bovina foi de 1980, sendo realizado pelos pesquisadores Mirolyubov & Barskov (1980). Neste ensaio clínico foram utilizadas pomadas à base de própolis. Para os animais portadores de mastite serosa e catarral foi administrada uma pomada com 2% de extrato etanólico de própolis, e na mastite purulenta e hemorrágica utilizou-se à pomada a 5%, ambas por via intramamária, sendo aplicados 5 mL duas vezes ao dia e 7 mL “overnight”. Os resultados do exame bacteriológico revelaram uma brusca diminuição de bactérias em todos os tipos da doença, exceto na purulenta. A produção de leite dos animais foi recuperada em 97% dos casos de mastite serosa, 96% da catarral, 83% da hemorrágica e 72% da purulenta. Dois animais com mastite purulenta apresentaram endurecimento do tecido glandular infectado e apenas 50% da produção foi recuperada. Os pesquisadores chegaram à conclusão que as pomadas a 2 e 5% apresentaram um ótimo efeito no tratamento da mastite encurtando o processo de cura.

Meresta & Meresta (1985b) trabalhando *in vitro* com cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina e amostras de extratos de própolis originários da Polônia, mostraram uma concentração mínima inibitória (MIC) em torno de 80 µg/mL.

Ao se empregar extrato de própolis no tratamento da mastite bovina, foi observado que a recuperação completa dos animais ocorreu em 86,6% dos casos de mastite aguda, 100% nos causados por *Candida albicans*, 91% por *Staphylococcus aureus*, 85% por *Escherichia coli* e 84% por *Streptococcus* sp., e que a própolis é bastante efetiva no tratamento desta enfermidade causada por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais (Meresta et al, 1989).

Uma infusão intramamária à base de própolis foi estudada quanto eficiência e inocuidade, utilizando-se doses terapêuticas até três vezes maiores. Foram analisados os seguintes parâmetros: temperatura da pele do úbere, condutividade elétrica, contagem de células somáticas e dosagem das concentrações de cloreto no leite coletado antes, durante e após o tratamento. Os resultados mostraram que a infusão não modificou a temperatura da pele

do úbere, mas aumentou a condutividade elétrica do leite acima dos níveis fisiológicos mesmo após o tratamento. Os níveis de cloreto aumentaram, mas não excederam o limite fisiológico. O aumento mais significativo foi quanto ao número de células somáticas, que esteve acima de 500.000 células/mL durante seis dias após o tratamento (Romvary et al, 1993).

Pinto (2000), em trabalho realizado *in vitro* com bactérias isoladas do leite de vacas com mastite, relatou que os extratos etanólicos de própolis inibiram o crescimento das amostras de bactérias Gram positivas, porém a Gram negativa, do tipo coliforme, não apresentou sensibilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de execução

Uma parte do experimento foi realizada no estábulo da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e em fazendas do município de Leopoldina na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, que constou do tratamento com própolis dos animais com mastite clínica ou subclínica; a outra parte, que consistiu da formulação da própolis, análises microbiológicas e contagem de células somáticas, foi realizada no Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária da UFV, com a participação do Setor de Apicultura do Departamento de Biologia Animal desta mesma instituição.

3.2. Animais

Como unidade experimental foi estabelecida a utilização do quarto mamário, pois, cada um é anatomicamente independente podendo apresentar infecções distintas. Inicialmente foram selecionadas 52 vacas em lactação, apresentando mastite clínica ou subclínica, constituindo um total de 77 quartos mamários afetados pela doença. No entanto, ao final do experimento, somente foi possível trabalhar com 42 quartos, visto que as dificuldades de trabalho a nível de campo com proprietários e tratadores de animais foram inúmeras, tais

como: desistência dos proprietários na continuação do tratamento e/ou de espera do período proposto para avaliação da terapia, mudanças constantes de empregados nas propriedades, aplicações de antibióticos durante o tratamento com a própolis, surgimento de outras doenças nos animais no decorrer do experimento. Estes fatos foram impossíveis de serem controlados em muitos casos, resultando na retirada desses animais do estudo.

Esses animais eram das raças holandesa pura ou mestiça de holandesa com zebu, com idade e número de partos variados entre a segunda e sétima gestação, provenientes do estábulo da UFV e de propriedades do município de Leopoldina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. A escolha dos animais para compor os grupos de estudo foi inteiramente casualizada.

De uma forma geral, nos locais onde foi montado o experimento, os animais eram ordenhados duas vezes ao dia através de ordenha mecânica ou manual e eram tomados os cuidados de desinfecção das tetas antes da ordenha. Os animais eram criados em sistema de estábulo ou soltos a campo.

3.2.1. Identificação dos animais com mastite

A identificação de animais apresentando mastite clínica ou subclínica foi feita através de exame clínico dos mesmos e avaliação de amostras de leite, por meio de métodos auxiliares de diagnóstico.

A - Exame clínico dos animais

Os animais foram examinados de acordo com a técnica de exame clínico preconizada por Rosenberg (1993), sendo verificado sinais de mastite clínica ou subclínica, bem como de outras doenças. Casos concomitantes de mastite clínica ou subclínica com outras enfermidades não foram selecionados para o grupo experimental.

B - Avaliação de amostras de leite

As amostras de leite foram submetidas às provas da caneca de fundo escuro, California Matitis Test, contagem de células somáticas por microscopia, isolamento e identificação dos microrganismos.

3.3 . Colheita das amostras de leite

Feita a identificação dos animais com mastite, as amostras de leite foram então colhidas. Inicialmente, as tetas dos animais eram lavadas com água corrente e secas com toalha de papel descartável. Os dois primeiros jatos de leite de cada quarto mamário foram analisados em caneca de fundo escuro. Em seguida, foi feita desinfecção da pele e meato do quarto(s) afetado(s) com álcool iodado e colhidos 20 mL de leite em frascos estéreis, que foram mantidos em caixa de isopor com gelo até sua chegada ao laboratório.

No laboratório, uma pequena alíquota de leite das amostras foi retirada para a realização da contagem de células somáticas, antes que as amostras fossem congeladas a - 18°C, para posterior análise microbiológica.

As amostras foram colhidas antes, durante e após o tratamento, visando acompanhar a eficiência do tratamento, usando – se como parâmetros o número de células somáticas e o resultado das análises microbiológicas.

3.4. Análises realizadas

3.4.1. California Matitis Test

Utilizou-se para este teste 2 mL de leite e 2 mL de reagente CMT¹ (solução detergente aniônica com indicador de pH, púrpura de bromocresol), observando-se a reação formada. Foi considerada como mastite subclínica reação equivalente ou superior a duas cruzes (2++).

¹ CMT FATEC. Rio de Janeiro – RJ

3.4.2. Contagem de células somáticas

As amostras de leite colhidas foram processadas para contagem de células somáticas por microscopia, seguindo a técnica prescrita por Prescott & Breed (1910), modificada por Figueiredo (1962). Para cada amostra foram confeccionados dois esfregaços, que foram corados pelo método de Charlett (1954) usado por Diniz (1997). As células presentes nos esfregaços foram contadas em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de 100x, de imersão, considerando-se como resultado a média do número de células dos dois esfregaços.

3.4.3. Análises Microbiológicas

Inicialmente as amostras congeladas de leite foram pré-incubadas a 37°C, por 18 horas. Posteriormente, com auxílio de uma alça de platina inoculava-se o material em placas contendo Ágar Sangue Base², adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubava-se a 37°C por 24-48 horas (National Mastitis Council, 1969). Havendo crescimento de colônias nestas placas, era feita a passagem de colônias puras para tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)³, incubando-se a 37°C por 24 horas. Do material presente no meio BHI era preparado um esfregaço e corado pelo método de Gram.

Paralelamente inoculava-se uma amostra de leite em placas de Ágar MacConkey⁴ para detectar bactérias Gram negativas, que poderiam estar presentes na amostra de leite (Quinn, 1994).

Logo após o isolamento dos microrganismos, foram realizadas provas específicas com o objetivo de identificar *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*.

3.4.3.1. Identificação de *Staphylococcus aureus*

² Merck S. A Rio de Janeiro – RJ

³ Difco Laboratories. Detroit – Michigan – EUA

⁴ Laboratório Biobrás. Montes Claros – MG

As colônias com características macroscópicas típicas desta espécie em meio ágar sangue foram avaliadas para a identificação completa do microrganismo através da sua morfologia (Bier, 1985), hemólise em ágar sangue (Bier, 1985; Quinn et al., 1994), morfologia e reação tintorial em esfregaço corado pelo método de Gram, catalase em lâmina e tubo (Quinn et al., 1994), crescimento em Ágar Baird-Parker⁵ (BP) (Silva et al., 1997), coagulase em tubo (Silva et al., 1997), reação da desoxirribonuclease em ágar DNase⁶ (Quinn et al., 1994) e fermentação do manitol⁷ (Quinn et al., 1994).

Quadro 4 – Características utilizadas para a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*

Características	Resultados
Hemólise	Positivo
Catalase	Positivo
Coagulase	Positivo
DNase	Positivo
Manitol	Positivo

Fonte: Kloos & Schleifer, 1986.

3.4.3.2. Identificação de *Streptococcus* sp

As espécies *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* são as mais frequentes causas de mastite bovina dentro deste gênero. Para sua identificação foram consideradas: a morfologia das colônias (Bier, 1985), hemólise em ágar sangue (Bier, 1985; Quinn et al., 1994), reação tintorial em esfregaço corado pelo método de Gram, catalase em lâmina e tubo (Quinn et al., 1994), CAMP test (National Mastitis Council, 1969; Quinn et al., 1994), fermentação da esculina (Little & Plastridge, 1946).

⁵ Laboratório Isofar. Jacareí – SP

⁶ Laboratório Biobrás. Montes Claros – MG

⁷ Difco Laboratories. Detroit – Michigan – EUA

Quadro 5 – Diferenciação de Streptococcus causadores de Mastite Bovina

Espécies	CAMP test.	Esculina	Hipurato de Sódio
<i>S. agalactiae</i>	+	-	+
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-
<i>S. uberis</i>	-	+	+

Fonte: Quinn et al., 1994.

3.4.3.3. Identificação de *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um agente etiológico ambiental importante da mastite bovina. A partir do crescimento de colônias típicas deste microrganismo em Ágar MacConkey (Quinn et al., 1994), seguiu-se a metodologia descrita por Silva et al. (1997) para se obter uma caracterização mais correta e segura do agente. Era inoculado 1 mL da amostra de leite suspeita em uma série de 3 tubos de Caldo Lauril Sulfato⁸(LST), incubando-se a 35°C por 24 horas. Em caso de crescimento com formação de gás, transferia-se uma alçada da cultura para tubos com Caldo Verde Brilhante Bile⁹ (VB) incubando-se a 35°C por 24 - 48 horas, e para tubos contendo Caldo *E. coli*¹⁰ (EC), colocando-os em incubação em banho-maria a 45,5°C por 24 horas. Havendo formação de gás nos tubos EC, era estriada uma alçada da cultura em placas com Ágar Eosina Azul de Metileno¹¹ (EMB), incubando-as a 35°C por 24 horas. Havendo colônias típicas nesse meio, transferiam-se duas colônias bem isoladas de cada placa para tubos inclinados contendo meio Agar para contagem em placas(PCA)¹², os quais eram incubados a temperatura e tempo, como anteriormente. A partir de culturas

⁸ Laboratório Isofar. Jacareí – SP

⁹ Laboratório Biobrás. Montes Claros – MG

¹⁰ Laboratório Isofar. Jacareí – SP

¹¹ Laboratório Isofar. Jacareí – SP

¹² Laboratório Merck S.A . Rio de Janeiro – RJ

puras, obtidas no meio PCA, fazia-se a coloração de Gram e provas bioquímicas: Indol¹³, Vermelho de Metila (VM)¹⁴, Voges-Proskauer (VP)¹⁵ e Citrato¹⁶.

3.5. Origem da própolis

A própolis utilizada neste estudo foi produzida na propriedade do apicultor Senhor Adomar Jesus de Carvalho - Itapecerica – MG, criador de colméias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Esta possuía cor verde e odor balsâmico.

3.6. Preparo do extrato de própolis

Para esse experimento foi utilizado o extrato etanólico de própolis a 70%, de acordo com a metodologia utilizada por Pinto (2000).

Inicialmente, a própolis era triturada em liquidificador e logo após, pesada em balança de precisão. A esse material era adicionado álcool etílico 95°GL¹⁷ diluído a 70% na proporção de 0,3g de própolis/mL de álcool, em seguida colocado sob agitação (200 rpm/minuto) a 45°C, por 48 horas. A mistura era filtrada em papel de filtro Whatman, número 1, obtendo-se o extrato de própolis a 70%.

3.7. Obtenção do extrato seco de própolis

Para remover o álcool, solvente empregado para obtenção do extrato de própolis a 70%, utilizou-se um aparelho evaporador rotativo¹⁸ com temperatura ajustada a 65°C, até a remoção total deste solvente. Em seguida, o material foi liofilizado a temperatura de -45 °C para remoção da água presente. Após a liofilização, o extrato seco de própolis obtido, foi acondicionado em recipiente de vidro âmbar e à temperatura de 0°C.

¹³ Difco Laboratories. Detroit – Michigan – EUA

¹⁴ Laboratório Isofar. Jacareí – SP

¹⁵ Laboratório Isofar. Jacareí – SP

¹⁶ Laboratório Merck S. A. Rio de Janeiro - RJ

¹⁷ Laboratório Synth. Diadema – SP

¹⁸ Evaporador rotativo TE 120 – Tecnal

3.8. Preparo da formulação com própolis

Devido ao poder irritante do álcool sobre tecidos e mucosas e à insolubilidade da própolis em água seria necessário utilizar um veículo, o mais adequado possível, que pudesse solubilizar a resina da própolis e ao mesmo tempo não irritar em demasia o tecido mamário. Considerando que não foram encontrados estudos sobre veículos utilizados para tratamento intramamário com própolis, procurou-se, por tentativas, avaliar alguns produtos como o dimetilsulfóxido (DMSO), o propilenoglicol, a glicerina e o óleo mineral, com melhores resultados na solubilidade da própolis obtidos com o dimetilsulfóxido. Por essa razão foi utilizado o DMSO como veículo. Entretanto, ressalta-se que como não se conhece estudo anterior sobre a interação DMSO e própolis, não se sabe se poderá haver interferência deste veículo sobre a atividade antimicrobiana da própolis.

A dose utilizada foi de 1g de resina de própolis por quarto mamário tratado, totalizando um volume de 20 mL da formulação com própolis por aplicação. Esta dose foi 2,5 vezes maior que a utilizada por Meresta & Meresta (1985 e 1989) em estudo *in vitro*. Foram tomados todos os cuidados de assepsia e desinfecção necessários para se ter uma fórmula inócua. Também foram realizados testes microbiológicos para comprovar a não contaminação da infusão antes de sua aplicação no animal.

Formulação com própolis:	1g de resina de própolis
	4mL de DMSO P.A.
	16mL de água destilada e autoclavada

Formulação apenas com veículo:	4mL de DMSO P. A.
	16mL de água destilada e autoclavada

As soluções formuladas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, fechados com tampas de borracha e vedados com aros de alumínio, e armazenados em geladeira a 4°C.

3.9. Tratamento dos animais

Nesse experimento foi utilizada a fração etanólica do extrato de própolis como citado anteriormente no item 36, empregando DMSO 20% como veículo.

Foram utilizados 42 quartos mamários de vacas com mastite clínica ou subclínica, divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo 1 – formado por 15 quartos mamários de vacas com mastite clínica tratados com própolis;

Grupo 2 – formado por 10 quartos mamários de vacas com mastite clínica que receberam somente o veículo;

Grupo 3– formado por 10 quartos mamários de vacas com mastite subclínica tratados com própolis;

Grupo 4 – formado por sete quartos mamários de vacas com mastite subclínica que receberam somente o veículo;

O tratamento era iniciado no máximo 24h após a identificação dos animais com mastite clínica ou subclínica. Eram feitas duas aplicações intramamária de 20 mL da formulação com própolis ou apenas do veículo, com intervalo de 24 horas.

Os grupos controles foram formados por animais, que receberam apenas o veículo (DMSO 20%) com o objetivo de verificar os possíveis efeitos desta substância química no tratamento da mastite bovina.

Paralelamente, foram realizadas colheitas de leite para avaliação do tratamento, seguindo o cronograma abaixo:

1º colheita – foi realizada antes da primeira aplicação da formulação com própolis ou do veículo, para verificar o número de células somáticas e o (s) agente (s) da mastite. Logo em seguida foi administrada a primeira aplicação.

2º colheita – o leite foi colhido 24 horas após a primeira aplicação da formulação com própolis ou do veículo, imediatamente antes da segunda aplicação.

3º, 4º e 5º colheitas – as amostras foram colhidas 48, 96 e 216 horas, respectivamente, após a primeira aplicação da formulação com própolis ou do veículo.

Foi estabelecido como parâmetros para comprovar a cura dos animais tratados, o desaparecimento dos sinais clínicos, diminuição do número de células somáticas e ausência do(s) microrganismo(s) causadores da infecção intramamária clínica ou subclínica, ao final do período de 10 dias após o início do tratamento.

3.10. Análise estatística

O resultado das provas microbiológicas das amostras de leite deste estudo foi analisado pelo Teste de Fisher, utilizando Programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM).

Para a avaliação estatística do número de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite clínica e subclínica tratadas com própolis e veículo (DMSO) utilizou-se:

- Teste t para dados pareados, realizado no Software SAEG/UFV versão 5.0.
- Programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM) utilizando o procedimento GLM (GENERAL LINEAR MODELS) e o delineamento inteiramente casualizado em estrutura de parcelas subdivididas, de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + r(T)_{jk} + A_j + TA_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Observação dos animais nas subparcelas que receberam os níveis i e j dos fatores T e A na K-ésima;

μ = Média geral;

T_i = Efeito do nível i do fator T na parcela, i = 1 e 2;

$r(T)_{jk}$ = Erro associado à parcela que recebeu o nível i do fator T na repetição K; $r(T)_{jk} \sim N(0, \sigma^2_{r(T)})$

A_j = Efeito do nível j do fator A na subparcela j = 1, 2, 3 e 4;

TA_{ij} = Efeito da interação dos fatores T e A;

ε_{ijk} = Erro associado a subparcela que recebeu os níveis i e j dos fatores T e A na repetição k, $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_\varepsilon)$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos efeitos da própolis no tratamento da mastite bovina clínica e subclínica é bastante complexa, devendo-se observar uma série de fatores que podem influenciar nos resultados.

Para que a mastite se instale no organismo animal é necessária a interação de vários fatores referentes ao microrganismo, hospedeiro e meio ambiente.

Como a própolis trata-se de um produto natural é necessário levar em consideração na avaliação das suas ações antimicrobiana e antiinflamatória, a sua complexa composição química, que pode variar com o tipo de abelha que a produz, região de localização das colméias, fonte de alimentação das abelhas e estação do ano de colheita. Também deve ser observado o método de obtenção do extrato e da resina de própolis, que pode levar à ocorrência de mais ou menos substâncias ativas necessárias às suas ações.

A interação da própolis com o veículo empregado na formulação medicamentosa não pode deixar de ser observada.

4.1. Atividade antimicrobiana da própolis no tratamento de mastite clínica

De acordo com o exame clínico dos animais e análise do leite realizada antes do início do tratamento, foi constatado que as vacas apresentavam inflamação do úbere, o leite continha grumos e em alguns casos pus. As

culturas bacteriológicas revelaram sete e quatro espécies de microrganismo, causando a enfermidade no grupo de animais tratados com a formulação de própolis e no que recebeu apenas o veículo (DMSO), respectivamente. Portanto, os animais apresentavam quadros típicos de mastite clínica.

No grupo de animais com mastite clínica que recebeu a formulação com própolis, verifica-se um total de 11 quartos mamários curados (Tabela 1). Já nos animais que receberam apenas o veículo, o número de cura foi de três quartos mamários (Tabela 1). Comparando-se estes dois valores pelo teste não paramétrico de Fisher, observou-se que houve diferença significativa entre estes tratamentos ($p < 0,05$). Esse resultado sugere, que a formulação com própolis exerceu atividade antimicrobiana nos casos de mastite clínica estudados neste trabalho. Resultados positivos com o uso da própolis nesta enfermidade também foram encontrados nos estudos, *in vivo*, de Mirolyubov & Barskov (1980) e Meresta et al. (1989).

Tabela 1 – Eficácia da formulação com própolis e influência do veículo (DMSO) no tratamento da mastite clínica e subclínica

Forma de mastite	Nº total de quartos tratados	Resultado dos tratamentos			
		Formulação com própolis (Própolis e DMSO)		Veículo (DMSO)	
		Curado	Não curado	Curado	Não curado
Clínica	225	11/15	4/15	3/10	7/10
Subclínica	17	2/10	8/10	0/7	7/7
Total	42	13/25	12/25	3/17	14/17

Esse número de 11 quartos mamários curados pode ter sofrido influência, de forma positiva ou negativa, de alguns fatores, tais como: existência de variações na resposta de animal para animal ao tratamento, provocadas pela espécie de microrganismo envolvida, localização dos sítios infectados na glândula mamária, a severidade da tumefação glandular e a

cronicidade da infecção. Isto pode ter ocasionado a não penetração das substâncias ativas da própolis nos focos infecciosos e, ou não ter alcançado o MIC necessário para o desenvolvimento completo do mecanismo de ação da própolis, que segundo Levy (1999) é complexo e baseia-se na desorganização da parede celular, da membrana plasmática e do citoplasma, impedindo a síntese protéica e divisão celular. Outra ação importante da própolis é a inibição da motilidade das bactérias, fator de virulência utilizado pelas mesmas para atingir e invadir os tecidos, sendo a inibição dos movimentos bacterianos dose-dependente (Mirzoeva et al., 1997). Também deve ser considerada na avaliação deste resultado, a concentração da própolis, a dose utilizada, número de aplicações, bem como o intervalo entre elas, pois, para que um tratamento seja eficiente é necessário que todos esses fatores sejam atingidos adequadamente.

A intensidade da resposta imunológica de cada animal pode ter contribuído no número de cura dos quartos mamários tratados, pois é conhecida sua relevante importância na resolução das infecções. Segundo Orsi et al. (2000), a própolis atua sobre a imunidade não específica do hospedeiro por ativação dos macrófagos. Entretanto, a literatura ainda é escassa sobre os efeitos da própolis na resposta imune (Sforcin, 1999).

De acordo com Marcucci (1995), Bankova et al. (1998), Seixas et al. (2000) e Soares et al. (2000), a composição química da própolis é complexa e variável. Fatores como flora disponível para a colméia, origem das amostras de própolis, período de colheita, variedade de abelhas *Apis mellifera*, concentração de seus constituintes, método de obtenção do extrato e da resina, são responsáveis por essa variação. Ainda de acordo com Marcucci et al. (1994) e Pereira et al. (1999), os flavonóides aglicônicos seguidos pelos ácidos fenólicos e seus ésteres são os principais componentes da própolis. E para Fernandes Jr. et al. (1995), os flavonóides são os responsáveis pelas atividades antiinflamatória e antimicrobiana deste apiterápico. Logo, a composição química da própolis utilizada neste estudo pode ter influenciado nos resultados encontrados, por falta ou quantidade insuficiente destes constituintes.

Na Tabela 2 observa-se que não houve cura de todos os casos de mastite clínica causados por *Staphylococcus aureus* neste ensaio. Este fato pode ter decorrido da existência de cepas mais contagiosas, virulentas ou persistentes (Larsen et al., 2000). Outro ponto a considerar é que este agente causa mastites graves e agudas, que podem tender a cronicidade. A tumefação da glândula e a oclusão dos ductos lactóforos por secreções anormais nos casos agudos, pode ter causado uma absorção fraca dos componentes químicos da própolis não ocorrendo a penetração completa na glândula mamária, fato que pode acontecer com muitas drogas segundo Pyörälä & Pyörälä (1998). Nos casos crônicos, a substituição gradual do tecido mamário por fibroso e a formação de abscessos com presença de pus podem ter contribuído tanto para isolar o *S. aureus* nos focos infecciosos, como para que não atingisse o MIC necessário para o combate da infecção.

Tabela 2 – Eficácia da formulação com própolis na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite clínica

Microrganismos	Nº de casos tratados	Resultado do tratamento	
		Curado	Não curado
Enterobacteria não classificada	1	1/1	0/1
<i>E. coli</i>	5	4/5	1/5
Levedura	3	3/3	0/3
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	3/4	1/4
<i>Staphylococcus</i> sp coagulase negativo	1	1/1	0/1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	2/3	1/3
<i>Streptococcus uberis</i>	5	4/5	1/5
Total	22	18/22	4/22

Segundo Radostits et al. (1994) e Waage et al. (1999) o emprego de antibiótico nas mastites clínicas provocadas por *S. aureus* promove cura microbiológica pequena. O resultado verificado neste trabalho (Tabela 2) e os

dados *in vitro* existentes na literatura como: Meresta & Meresta (1985), Brumfitt et al. (1990), Vargas et al. (1994), Goulart (1995), Kujumgiev et al. (1999) e Pinto (2000) sugerem que nestes casos a própolis pode ser uma forma alternativa de tratamento.

Na Tabela 2, verifica-se que a formulação com própolis não foi efetiva em todos os casos de mastite clínica causados por *Streptococcus agalactiae*. Tal fato pode ter decorrido de fatores relacionados à própria bactéria, aos animais em estudo, ao ambiente, tipo e grau de infecção, composição da própolis e número baixo de amostras.

O *Streptococcus agalactiae* tende a causar mastites crônicas, endêmicas e de grande contagiosidade. Encontra-se presente no leite e na superfície dos canais galactóforos, não invadindo os tecidos. Esta particularidade levaria a se acreditar que a própolis poderia atuar com mais facilidade sobre a bactéria. No entanto, sua rápida multiplicação provoca um aumento de neutrófilos dentro dos ductos com conseqüentes danos na sua estrutura, obstrução e fibrose dos tecidos alveolares, podendo ter prejudicado o mecanismo de ação da própolis, que de acordo com Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) seria de prevenir a divisão celular, causar defeitos na estrutura da parede celular, alterar a membrana citoplasmática e inibir a síntese protéica desta bactéria. Além disso, este *Streptococcus* possui polissacarídeos capsulares antifagocíticos, que dificultam a sua eliminação pelas células fagocíticas.

Era esperado que a *Escherichia coli*, sendo uma bactéria Gram negativa, não fosse sensível à própolis. No entanto, como se observa na Tabela 2 houve sensibilidade a este apiterápico. Este resultado difere dos dados encontrados nos trabalhos *in vitro* de Meresta & Meresta (1995), Brumfitt et al. (1990), Vargas et al. (1994), Woisky et al. (1994), Goulart (1995), Park et al (1997), Kujumgiev et al. (1999), Pereira (1999) e Pinto (2000). Já Meresta et al. (1989) empregando extrato de própolis no tratamento da mastite bovina, observaram uma recuperação completa de 85% dos animais acometidos por *E. coli*. Langoni et al. (1994) encontraram uma eficácia antimicrobiana do extrato de própolis, *in vitro*, de 91% sobre a *E. coli*.

Outros trabalhos, como os realizados por Bonhevi et al. (1994), Fernandes Jr. et al. (1997), Mirzoeva et al. (1997) e Barizon et al. (1999)

mostram atividade antibacteriana da própolis sobre bactérias Gram negativas, como a *E. coli*.

Este resultado da formulação com própolis sobre a *E. coli* pode ter sido influenciado pela interação dos fatores de virulência da bactéria, dos animais tratados e do meio ambiente já mencionada para os microrganismos acima discutidos. O caráter variável da composição da própolis pode também ter refletido sobre sua ação, já que Koo et al. (1999) verificaram que sua atividade biológica nessa espécie bacteriana foi bastante variável, dependendo da região de colheita da própolis.

A mastite causada pela *E. coli* é do tipo aguda e edematosa, podendo tornar-se crônica. Como esta bactéria se multiplica rapidamente nos quartos mamários levando a uma reação inflamatória, que destrói grande proporção dessa população bacteriana, pode-se inferir que a reação celular é de fundamental importância na cura. Além dos resultados desfavoráveis dos estudos *in vitro*, deve ser considerado que a literatura é escassa sobre a ação da própolis na resposta celular e no seu mecanismo de ação sobre bactérias Gram negativas, portanto não se pode chegar a conclusões definitivas, apenas sugerir que a sensibilidade da *E. coli* à própolis ocorrida neste trabalho e em outros, *in vivo*, seja decorrente do quadro inflamatório com aumento do número de células, dentre elas os macrófagos, e da penetração adequada dos componentes da própolis nos focos infecciosos, uma vez que não ocorre fibrose dos tecidos neste tipo de mastite. Esta sensibilidade da *E. coli* à própolis verificada neste estudo, *in vivo*, é importante, pois esta bactéria tem a particularidade de causar toxemia e morte dos indivíduos se o tratamento instituído não for eficiente. Entretanto, uma vez ocorrida a cura dos animais, a glândula mamária volta à sua capacidade ótima de produção de leite em lactações subseqüentes. Outra possibilidade que pode ter ocorrido, é o aumento do número de células somáticas em função de estímulo ou até mesmo de irritação da glândula pela própolis.

De acordo com a literatura, as bactérias Gram positivas mostram-se sensíveis à ação antimicrobiana da própolis. Neste estudo, foi verificado que o *Streptococcus uberis* apresentou sensibilidade ao tratamento com própolis (Tabela 2), corroborando com os resultados de Vargas et al. (1994) e Pinto (2000). É um patógeno ambiental que causa mastites agudas, que geralmente

progridem para a cura. Logo sua virulência e patogenicidade são mais brandas. Provavelmente, tudo isso tenha contribuído para que as substâncias ativas da própolis atingissem concentrações ideais na glândula mamária para combater esta bactéria em quatro casos dos cinco tratados com a formulação de própolis.

As leveduras não são agentes etiológicos comumente encontrados na mastite. Hoffmann et al. (1998) e Barizon et al. (1999) obtiveram dados que comprovam a eficiência da própolis sobre estes microrganismos. O presente trabalho também revelou resultado semelhante (Tabela 2), provavelmente ocorrido pela ação potencializadora da própolis sobre as células somáticas, produzindo um aumento do número das mesmas no úbere. A literatura ainda é muito escassa sobre o assunto.

Um ponto importante que deve ser observado é a possível influência do veículo (DMSO) empregado na formulação com própolis sobre os efeitos deste apiterápico no tratamento dos casos de mastite clínica aqui estudados. A literatura possui poucas informações a respeito dos efeitos deste veículo nas infecções intramamárias, e nenhuma citação sobre seu comportamento ao ser utilizado conjuntamente com a própolis.

No grupo de animais com mastite clínica, que recebeu apenas o veículo (DMSO) foram observados três casos curados e sete não curados (Tabela 1). Analisando a taxa de cura por microrganismo presente na infecção, constatou-se que ela foi baixa nos casos causados por *E. coli* e *Streptococcus uberis* (Tabela 3). Nas infecções provocadas por *S. aureus* e *Enterobacter aerogenes* o número de amostras foi insuficiente para permitir conclusões (Tabela 3).

Langoni et al. (1984) relatam que o uso de antimastíticos veiculados em DMSO a 20%, *in vivo*, é muito favorável ao tratamento das mastites, ressaltando que deve ser reservado para casos de resistência múltipla a antibiótico. Fazendo-se uma analogia com o resultado do presente trabalho é necessário considerar dois pontos: no primeiro trabalho foram utilizadas drogas sintéticas e no segundo um produto natural (própolis) ainda carente de estudos sobre composição, mecanismo de ação, toxicidade, dentre outros aspectos, e um outro ponto foi à impossibilidade de formação de um grupo controle que não recebesse nenhuma substância, que permitiria maior número de informações sobre a ação potencializadora ou não do DMSO sobre a própolis.

Tabela 3 – Influência do veículo (DMSO) na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite clínica

Microrganismos	Nº de casos tratados	Resultado do tratamento	
		Curado	Não curado
<i>Enterobacter aerogenes</i>	02	1/2	1/2
<i>E. coli</i>	06	1/6	5/6
<i>Staphylococcus aureus</i>	01	0/1	1/1
<i>Streptococcus uberis</i>	04	1/4	3/4
Total	13	3/13	10/13

Por um lado, ao mesmo tempo em que o veículo (DMSO) possa ter aumentado a permeabilidade da parede celular das bactérias, facilitando a penetração das substâncias ativas da própolis, ou que o veículo ao penetrar em grande quantidade possa ter suplantado a capacidade e velocidade de produção das enzimas destas bactérias tomando-as mais sensíveis à própolis. Por outro lado, ele pode ao ter aumentado a permeabilidade da parede, permitido que as enzimas bacterianas se difundissem em maior quantidade nos tecidos, destruindo os componentes da própolis em proporção maior do que ocorreria com a parede íntegra, por conseguinte reduzindo a eficiência da formulação intramamária de própolis utilizada.

Logo, é possível apenas sugerir que o veículo tenha exercido algum efeito positivo ou negativo não significativo sobre o mecanismo de ação da própolis no quadro infeccioso destes casos de mastite clínica estudados.

4.2. Atividade antimicrobiana da própolis no tratamento de mastite subclínica

Os animais apresentando mastite subclínica foram identificados através do “California Mastitis Test” (reação igual ou superior a duas cruzes) e do número de células somáticas (contagem maior que 500.000 células/mL de leite). O leite destas vacas apresentava aspecto normal e os animais não

demonstravam nenhum sinal de inflamação nos úberes, portanto caracterizando mastite subclínica.

De acordo com a análise dos dados apresentados na Tabela 1 sobre a eficácia da formulação com própolis e a influência do veículo (DMSO) no tratamento da mastite subclínica, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). É importante ressaltar que este resultado sofreu influência do baixo número de amostras, uma vez que só foi possível trabalhar com 17 quartos mamários neste experimento.

Os resultados da eficiência desta formulação com própolis nos microrganismos presentes nas infecções tratadas sugerem que ela pode ter exercido alguma ação antimicrobiana sobre a *E. coli* e nenhuma sobre *S. aureus* (Tabela 4). Ressaltando que dos dez quartos mamários tratados, oito quartos apresentavam infecção mista com presença de *S. aureus*, não ocorrendo nenhum caso de cura dos mesmos. Esse fato contraria vários trabalhos científicos, que relatam o efeito antimicrobiano da própolis sobre *S. aureus* e nenhum sobre *E. coli*, tais como: Meresta & Meresta (1985), Brumfitt et al. (1990), Vargas et al. (1994), Woisky et al. (1994), Goulart (1995), Park et al. (1997), Kujumgiev et al. (1999) e Pinto (2000).

Tabela 4 – Eficácia da formulação com própolis na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite subclínica

Microrganismos	Nº de casos tratados	Resultado do tratamento	
		Curado	Não curado
<i>Enterobacter aerogenes</i>	01	1/1	0/1
<i>E. coli</i>	03	3/3	0/3
<i>Staphylococcus aureus</i>	08	0/8	8/8
<i>Streptococcus uberis</i>	01	1/1	0/1
Total	13	5/13	8/13

Esse resultado pode ter sofrido influência dos fatores de virulência dos microrganismos envolvidos, da reação celular na glândula mamária dos animais, da composição, concentração e mecanismo de ação da própolis, dose utilizada, número de aplicações e intervalo entre elas.

A resposta negativa do *S. aureus* a esta formulação com própolis, provavelmente foi em função de uma pequena resposta do sistema imunológico quando da instalação desse microrganismo na glândula mamária, levando a sua permanência neste local e o desenvolvimento de sua patogenicidade com substituição gradual do tecido mamário secretor por fibroso, com conseqüente desenvolvimento de uma barreira tecidual, impedindo a chegada dos componentes da própolis nos focos infecciosos, prejudicando seu mecanismo de ação. Segundo Quinn et al. (1994), este fato ocorre freqüentemente com os antibióticos.

A sensibilidade da *E. coli* apresentada à formulação com própolis neste estudo, *in vivo*, pode ter ocorrido em virtude desta bactéria estar presente há pouco tempo colonizando a glândula mamária, não dando tempo suficiente para o desenvolvimento completo da sua patogenicidade, contribuindo para que a própolis atingisse o MIC necessário para combater a infecção. Outro ponto importante para este resultado, foi o desenvolvimento rápido da resposta celular com aumento do número de células somáticas verificada com a primeira aplicação da infusão de própolis (Tabela 8), ocorrida em função de estímulo no sistema imunológico ou até mesmo de uma possível irritação da glândula mamária pela própolis, levando a eliminação destas bactérias, por aumento da fagocitose.

Segundo Homan & Wattiaux (1996) apesar das bactérias coliformes causarem menos de 1% dos casos de mastites, elas são mais aptas a produzirem mastite clínica que os *Streptococcus* e *Staphylococcus*.

No grupo de animais que receberam o veículo, verifica-se que não ocorreu nenhum efeito antimicrobiano sobre as bactérias Gram positivas e negativas causadoras de infecção subclínica na glândula mamária dos mesmos (Tabela 5). Esse resultado difere do observado por Langoni et al. (1994), que afirmam ser o DMSO a 20% muito favorável no tratamento das mastites, e se aproxima dos dados encontrados por Côrrea & Côrrea (1994) ao trabalhar com *S. aureus* isolado de mastite bovina em placas com e sem DMSO, que demonstraram que nem sempre seu efeito é extenso e nem tão nítido.

Tabela 5 – Influência do veículo (DMSO) na eliminação dos microrganismos presentes nos quartos mamários de vacas com mastite subclínica

Micr organismos	Nº de quartos tratados	Resultado do tratamento	
		Curado	Não curado
<i>Enterobacter aerogenes</i>	01	0/1	1/1
<i>E. coli</i>	02	0/2	2/2
<i>Staphylococcus aureus</i>	06	0/6	6/6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	01	0/1	1/1
Total	10	0/10	10/10

Com base nestes resultados, pode-se inferir que o veículo provavelmente não interferiu nas ações da própolis sobre as infecções intramamárias subclínicas, nas condições existentes nesse experimento.

4.3. Número de células somáticas (NCS) no leite de vacas com mastite clínica submetidas a tratamento com própolis

Como foi discutido no item 4.1, o leite dos animais apresentava aspecto anormal devido à presença dos produtos da reação inflamatória, sendo comprovado pelo aumento do número de neutrófilos, de outros tipos de leucócitos e de células epiteliais, que recebem a denominação geral de células somáticas.

Na Tabela 6, observa-se que a média do NCS encontrava-se elevada antes do tratamento, comprovando juntamente com as anormalidades do leite e sinais clínicos um quadro de mastite clínica nestes animais.

Avaliando-se o número médio de células somáticas no leite dos animais antes do início do tratamento com a formulação intramamária de própolis com as médias das colheitas entre 24 e 216 horas após a primeira aplicação, verifica-se uma redução significativa destas células (Tabela 6). Os dados revelaram uma redução significativa do valor médio do número de células somáticas no leite entre as colheitas 24, 48 e 216 horas após a primeira aplicação, e não significativa entre as médias das colheitas 48 e 96 horas após a primeira aplicação (Tabela 7). Esses resultados indicam uma redução do

Tabela 6 – Comparação do número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite clínica no início do tratamento com a diferença das médias obtidas 24, 48, 96 e 216h após a primeira aplicação da formulação com própolis ou veículo. (x 10⁶ células/mL leite)

Tratamento	Início do tratamento	Durante e após o tratamento			
		24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
Formulação com própolis (própolis + DMSO)	5,78 (5779239)	-1,78* (3994174)	-2,23* (3547537)	-2,46** (3321960)	-3,71*** (2065413)
Veículo(DMSO)	4,00 (3999295)	1,64*** (5644071)	3,77*** (7768582)	2,98*** (6983286)	2,30** (6299903)

* Médias de células somáticas que diferem significativamente da média inicial pelo teste T (p < 0,05).

** Médias de células somáticas que diferem significativamente da média inicial pelo teste T (p < 0,001).

*** Médias de células somáticas que diferem significativamente da média inicial pelo teste T (p < 0,0001).

Tabela 7 – Número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite clínica após o início do tratamento.

Tratamento	Número médio de células/mililitro de leite			
	Após início do tratamento			
	24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
Formulação com própolis (própolis + DMSO)	15,08 ^{a1} (3994174,27)	14,78 ^b (3547536,60)	14,70 ^b (3321960,27)	14,15 ^c (2065413,27)
Veículo (DMSO)	15,53 ^a (5644071,30)	15,85 ^a (7768582,20)	15,74 ^a (6983286,30)	15,64 ^a (6299903,20)

^{1/} Para a variável analisada, a letra minúscula codifica a análise estatística em cada linha. Os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK).

nível de infecção, que pode ser comprovada pela taxa de cura observada nas Tabelas 1 e 2, e conseqüente diminuição do número de células de defesa e epiteliais nos quartos mamários, que normalmente estão aumentadas na presença de infecções. Provavelmente à medida que a própolis foi atuando sobre os microrganismos causadores da infecção, os produtos resultantes do processo inflamatório foram diminuindo.

De acordo com a Tabela 6 no grupo de animais que recebeu apenas o veículo (DMSO), houve um aumento significativo entre a média do número de células somáticas antes do início do tratamento e as médias das colheitas entre 24 e 216 horas após a primeira aplicação da formulação do veículo (DMSO). Também se verifica uma elevação não significativa entre as médias das colheitas 24 e 48 horas após a primeira aplicação, seguida por uma redução não significativa entre as médias das colheitas 48, 96 e 216 horas após a primeira aplicação, no entanto os valores continuaram muito elevados após a primeira aplicação (Tabela 7). Esses dados indicam uma persistência da infecção nos quartos mamários tratados, comprovada pela baixa taxa de cura observada na Tabela 3. Um dos fatores mais importantes para um número elevado de células somáticas no úbere é a presença de microrganismos, alguns com maior e outros com menor capacidade de estimular a produção e recrutamento de células para o local da infecção. Os resultados relativos ao isolamento microbiológico comprovam esta observação (Tabela 3).

Estes resultados sugerem que a formulação intramamária à base de própolis exerceu ação nos processos inflamatório e infeccioso da mastite clínica causados por patógenos contagiosos e ambientais, levando a cura da maior parte dos casos estudados (Tabela 1 e 2).

4.4. Número de células somáticas (NCS) no leite de vacas com mastite subclínica submetidas a tratamento com própolis

O leite dos animais com mastite subclínica apresentava todas as características relatadas no item 4.2. Além disso, apresentava uma média do NCS dentro da faixa de 500.000 – 1.000.000 células/mL de leite (Tabela 8), mencionada por Homan & Wattiaux (1996) como indicativa desse tipo de mastite.

Tabela 8 – Comparação do número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite subclínica no início do tratamento com a diferença das médias obtidas 24, 48, 96 e 216h após a primeira aplicação da formulação com própolis ou veículo. ($\times 10^5$ células/mL leite)

Tratamento	Início do tratamento	Durante e após o tratamento			
		24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
Formulação com própolis (própolis + DMSO)	8,00 (799876)	4,16*** (1215957)	0,32 ^{ns} (831956)	-2,53** (546555)	-5,00*** (303384)
Veículo (DMSO)	6,00 (600399)	-0,92* (508285)	-1,35** (465144)	-2,31** (368461)	0,34 ^{ns} (634549)

* Médias de células somáticas que diferem significativamente da média inicial pelo teste T ($p < 0,05$).

** Médias de células somáticas que diferem significativamente da média inicial pelo teste T ($p < 0,001$).

*** Médias de células somáticas que diferem significativamente da média inicial pelo teste T ($p < 0,0001$).

^{ns} Médias de células somáticas que não diferem significativamente da média inicial pelo teste T ($p > 0,05$).

Os dados da Tabela 8 revelaram, para os quartos mamários tratados com a formulação de própolis, que houve entre a média do número de células somáticas antes do início das aplicações e as médias das colheitas 24, 96 e 216 horas após a primeira aplicação um aumento em 24 horas e uma redução em 96 e 216 horas significativas. Na Tabela 9, verificou-se uma diminuição significativa entre as médias das colheitas 24, 48, 96 e 216 horas após a primeira aplicação. Estes resultados sugerem que a formulação intramamária de própolis, em um primeiro momento, estimulou o aumento da resposta inflamatória dos animais tratados, possivelmente por meio de um mecanismo irritativo. Em seguida, essa resposta foi sendo reduzida, provavelmente devido à redução do nível de infecção da glândula mamária, com conseqüente redução ou eliminação de um dos principais fatores responsáveis pelo aumento do número de células, que são os microrganismos. Na Tabela 4, pode ser observada a eliminação dos microrganismos ambientais de todos os quartos tratados.

Tabela 9 – Número médio de células somáticas presentes no leite de vacas com mastite subclínica após tratamento

Tratamento	Número médio de células/mililitro de leite			
	Após início do tratamento			
	24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
Infusão de própolis (própolis + DMSO)	13,99 ^{a1} (1215957,30)	13,59 ^b (831955,60)	13,17 ^c (546554,80)	12,59 ^d (303384,40)
Veículo(DMSO)	13,12 ^b (508285,29)	13,03 ^b (465143,86)	12,79 ^c (368461,43)	13,35 ^a (634548,71)

^{1/} Para a variável analisada, a letra minúscula codifica a análise estatística em cada linha. Os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK).

Essa redução do número de células somática verificada com o tratamento a base de própolis neste estudo é muito importante, pois de acordo com Brito & Brito (1998) a reação inflamatória altera a composição do leite tanto em termos de quantidade quanto de qualidade.

Na Tabela 8, para os animais que receberam apenas o veículo, constatou-se que entre a média do número de células somáticas antes do início das aplicações e as médias das colheitas entre 24 e 216 horas após a primeira aplicação, houve uma diminuição significativa em 24, 48 e 96 horas e um aumento não significativo em 216 horas.

Os dados da Tabela 9 mostraram, para os animais que receberam apenas o veículo (DMSO), uma redução não significativa entre as médias das colheitas 24 e 48 horas após a primeira aplicação do veículo e significativa entre as médias das colheitas 48 e 96 horas após a primeira aplicação. Logo em seguida, houve um aumento significativo entre as médias das colheitas 96 e 216 horas após a primeira aplicação. Provavelmente, a redução do número de células tenha sido causada por uma pequena e efêmera ação do veículo. Passado esse efeito, o quadro dos casos agravou-se, levando os animais a responderem com mais intensidade, aumentando o número de células na tentativa de debelar a infecção. Este fato corrobora com a inexistência de curas microbiológicas (Tabela 5).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente estudo, pode-se concluir que:

- A formulação intramamária de própolis apresentou ação antimicrobiana nos casos de mastite clínica.
- O *Staphylococcus aureus* apresentou sensibilidade à formulação intramamária de própolis, na mastite clínica.
- A sensibilidade da *E. coli* à própolis contradiz a literatura, requerendo mais estudos para ser empregada como tratamento de mastite clínica causada por esse microrganismo.
- A formulação com própolis teve um efeito menor contra os microrganismos presentes na mastite subclínica.
- A própolis não foi eficaz no tratamento de mastite subclínica causada pelo *Staphylococcus aureus*.
- O *Streptococcus uberis* foi sensível à própolis, nas duas formas de mastite.
- Os microrganismos, na mastite subclínica, não foram sensíveis à formulação contendo apenas o veículo (DMSO).
- A formulação de própolis foi eficaz na redução do número de células somáticas no leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journal of Chromatography**, v.242, p.135-143, 1982.
- BANKOVA, V.S., DYULGEROV, A., POPOV, S., EVSTATIEVA, L., KULEVA, L., PUREB, O., ZAMJANSAN, Z. **Apidologie**, V.23, p. 79-85. 1992.
- BANKOVA, V., KRASTEVA, G.B., POPOV, S., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, p.361-367, 1998.
- BARIZON, E., OLIVEIRA, P., FIGUEIREDO, E., FIGUEIREDO, L.C., BASTOS, J.K., SALVADOR, S.L. Determinação da atividade antimicrobiana da própolis em solução alcóolica, mel e mel com própolis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS, I. Franca, S.P, 1999, **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.51, 1999.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
- BISHOP, J.R., BODINE, A.B, ODEELL, G.D. Retention data for antibiotics commonly used for bovine infections. **Journal Dairy Science**., v.67, p.537 – 540, 1984.
- BONVEHI, J.S., COLL, F.F., JORDÁ, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemists Society**, v.71, n.5, p.529-532, 1994.

- BRITO, J.R.F., CALDEIRA, G.A.V., VERNEQUE, R.S., BRITO, M.A.P. Sensibilidade e especificidade “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação contagem de células somáticas. **Pesq. Vet. Bras.**, v.17, n.2, p.49 – 53, 1997.
- BRITO, M.A.V.P., BRITO, J.R.F. O efeito da mastite no leite. In: BRITO, J.R.F., DIAS, J.C. A qualidade do leite. Juiz de Fora: Embrapa/São Paulo: Tortuga, p. 83-90, 1998.
- BRUMFITT, W., HAMILTON-MILLER, J.M.T., FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. **Microbios**, n.62, p.19-22, 1990.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.
- CALVINHO, L.F., ALMEIDA, R.A., OLIVER, S.P. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.61, n.1-2, p.93-110. 1999
- CHABEAUDIE N., Le JAN, C., OLIVER, M., SALMON, H. Lymphocyte subsets in the mammary gland of sows. **Res. Vet. Sci**, v. 55, p. 351 – 355, 1993.
- CHARLLET, S.M. An improved staining method for the direct microscopical counting of bacteria in milk. **Dairy Industr**, v.19, n.8, p.652-653, 1954.
- CHMIELEWSKA, H.R., MUSZYNSKA, J., KONOPACKA, Z. Antibacterial activity of propolis as affected by the conditions of its collection. **Pszczelnicze Zeszyty Nauhowe**, v.35, p.47-53, 1991.
- CIZMARIK, J., MACICKA, M., MATEL, I. Analisis y critica de las teorias acerca de la formacion del Propoleos. In: **Propoleos – Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**, Apimondia, Bucarest, 1975. 175p.
- CORREA, W.M., CORREA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Medsi. 1992. 843p.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S, GÓRNIAC, S.L, BERNADI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.422 – 434. 1999.
- COVA, W.G. Prática sensitiva de detecção de penicilina no leite. **Higiene Alimentar**, v.3, n.2, p.100-112. 1984.
- DINIZ, M.A.P.R. **Efeito do ácido acetilsalicílico e de enzimas na mastite de vacas lactantes e interferência residual na fermentação láctea**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- DONADIEU, Y. **La Propolis**. Paris: Maloine, p.14-15, 1890.

- FAGUNDES, C.M. **Persistência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais prevalência no leite tipo B e C consumido em Belo Horizonte**. Belo Horizonte, MG: Escola de Veterinária da UFMG, 1980. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1980.
- FARIA, J.E. **Prevenção e controle de infecção estafilocócica da glândula mamária pela vacinação e/ou antibioticoterapia associada ao dimetilsulfóxido (DMSO)**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1995. 101 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.
- FERNANDES Jr.A., SUGIZAKI, M.F., FOGO, M.L. et al. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.1, n.2, p.1-5, 1995.
- FIGUEIREDO, J.B. Estudo sobre a mamite bovina no município de Betim, Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v.14, p.257-295, 1962.
- FILHO, L.G.P., AZEVEDO, J.L., FLECHTMANN, C.H.W. Antimicrobianos em própolis de *Apis Mellifera*. **Boletim Indústria animal**, v.20, p.399-403, 1962.
- GERMANO, P.M.L., GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene alimentar**, v.9, n.36, p. 12 – 16, 1995.
- GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. Salvador, BA: UFBA, 1995. 18p. Monografia. Escola de Medicina Veterinária – Universidade Federal da Bahia, 1995.
- GRAAF, T., DWINGER, R.H. Estimation of milk production losses due to sub-clinical mastitis in dairy cattle in Costa Rica. **Preventive Veterinary Medicine**, v.26, n.3-4, p. 215 – 222, 1996.
- GRANGE, J.M., DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.159-160, 1990.
- GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis. **Bee World Benson**, v.71, p.107-118, 1990.
- GREENAWAY, W., SALATINO, M. L. F., SALATINO, A. SIMCRO, Brasil, p.37. 1993.
- HOFFMANN, F.L., GRACIA-CRUZ, C.H., CARMELLO, M.T., DUTRA, A.L., VINTURIM, T.M. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de três produtos farmacêuticos à base de própolis. **Higiene Alimentar**, v.12, n.53, p.57-60, 1998.

- HOGAN, J.S., SMITH, K.L. A practical look at environmental. NATIONAL MASTITIS COUNCIL, p. 342, 1997 (<http://www.nmconline.org>).
- HOMAN, E.J., WATTIAUX, M.A. **Technical dairy guide: lactation and milking**. 2.ed. Wisconsin, USA: The Babcock Institute for International Dairy, p. 57 – 70, 1996.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n.7, p.2103 – 2112, 1994.
- IOIRISH, N. Propoleos. In: COMISION PERMANENTE DE TECNOLOGIA Y UTILLAJE APICOLAS. **Un valioso producto de la apicultura Propoleos – Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**. Bucarest: 1975. P.89-90.
- JOHNSON, G. Swedish scheme for the control of inhibitory substances. **Bulletin of the Internation Dairy Federation**, n.283, p. 59, 1993.
- KEDZIA, B., HOLDERNA, E. Investigations on the combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus*. **Herba-Polonica**, v.32, n.3/4, p.187-195, 1986.
- KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987. 612p.
- KLOOS, W.E., SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus*. In: SNEATH, P.H.A. (Ed.) **Bergey's manual os systematic bacteriology**. Baltimore: Williams, e Wilkins, 1986.v.2, p.1013-1055.
- KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., PARK, Y.K., IKEGAKI, M. Avaliação do potencial anti-cárie e anti-placa da própolis de *Apis mellifera* da região sudeste e sul do Brasil. † Atividade antimicrobiana *in vitro* sobre patógenos bucais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS, I. Franca, S.P, 1999, **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.48, 1999.
- KORHONEN, H., KAARTINEN, L. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: SANDHOLM, M., HONKANEN-BUZALSKI, T., KAARTINEN, L., PYORALA, S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki, University of Helsinki-Faculty of Veterinary Medicine, p.76-82, 1995.
- KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., PIETZ, G., CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel Forschung**, v.43, n.5, p.607-609, 1993.
- KUJUMGIEV, A., BANKOVA, V., IGNATOVA, A., POPOV, S. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharmazie**, v.48, n.10, p.785-786, 1993.

- KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p. 235-240, 1999.
- LANGONI, H., DOMINGUES, P.F., FUNARI, S.R.C., CHANDE, C.G., NEVES, I.R., LISTON, F.J.P. Efeito antimicrobiano *in vitro* da propolis. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4, 1994,. Rio Cuarto, Argentina, **Anais...** Rio Cuarto, Argentina: Editora, 1994. p. 189-192.
- LARSEN, H.D., SLOTH, K.H., ELSBERG, C., ENEVOLDSEN, C., PEDERSEN, L.H., ERIKSEN, N.H.R., AARESTRUP, F.M., JENSEN, N.E. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramamary infection in nine Danish dairy herds. **Veterinary Microbiology** . v.71, n.1-2, p.89-101, 2000.
- LEVY, N.C. Atividade antimicrobiana da própolis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS, I. Franca, S.P, 1999, **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.18, 1999.
- LITTLE, R.B., PLASTRIDGE, W.N. **Bovine mastitis**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1946, 546p.
- MAKASHVILI, Z.A. De la historia de la utilizacion del propoleos . In: COMISION PERMANENTE DE TECNOLOGIA Y UTLAJE APICOLAS. **Un valioso producto de la apicultura: Propoleos – Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**, Bucarest: 1975. p. 7-8.
- MARCUCCI, M.C., SALATINO, M.L., SALATINO, A., LOPES, C.M.A. Estudo químico e biológico de própolis brasileiras. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4, Córdoba, Argentina, **Anais....** Córdoba, Argentina, 1994. p.193-196.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v.26, n.2, p. 83-99, 1995.
- MATTOS, L.M., MAIA, A.B.R.A., NELSON, D.L. Dosagem de quercetina em própolis. **Revista da Universidade de Franca**, v.7, n.7, p.34-35, 1999.
- MERESTA, L., MERESTA, T. Antibacterial activity of flavonoid compounds of propolis, occuring in flora in Poland. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.28-29, n.1-4, p.61-63, 1985.
- MERESTA, L., MERESTA, T. Sensitivity of bovine mastitis bacteria to propolis in vitro. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 41, n.8, p.489-492, 1985.
- MERESTA, L., MERESTA, T., BURDZINSKI, J., CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using na extract of propolis. **Medycyna Weterynaryjna**, v.45, n.7, p.392-395, 1989.

- MIROLYUBOV, M.G., BARSKOV, A.A. Propolis for bovine mastitis. **Veterinariya**, n.2, p.45-46, 1980.
- MIRZOEVA, O.K., GRISHANIN, R.N., CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis**. Washington D. C.: University of New Hampshire Press, 1969. 27p.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4th ed. Madison: The National Mastitis Council Press, 1998. 64p.
- NEMETH, J., MUCKLE, C.A., GYLES, C.L. *In vitro* comparison of bovine mastitis and fecal Escherichia coli isolates. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.3-4, p.231-238, 1994.
- NIKOLAEV, A.B. Defensa de la ciudad de las abejas. In: COMISION PERMANENTE DE TECNOLOGIA Y UTILLAJE APICOLAS. **Un valioso producto de la apicultura: Propoleos – Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**, Bucarest: 1975. P. 8-10.
- OBREGON, A.M., ROJAS, N. Antimicrobial action of alcoholic extrats of propolis. **Revista Cubana de Farmacia**, v.24, n.1, p.34-44, 1990.
- PAULINO, N. Reação de hipersensibilidade à própolis. **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.16, 1999.
- PEREIRA, M.L. Atividade antibacteriana. **Revista da Universidade de Franca**, Franca, n.7, p.20, 1999.
- PINTO, M.S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PRESCOTT, S.C., BREED, R.S. The determinacion of number of body cells in milk by a direct method. **Journal Infect Disease**., v.7, n.5, p.632-640, 1910.
- PYÖRÄLÄ, S.H.K., PYÖRÄLÄ, E.O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989 – 1995). **Javma**, v.212, n.3, p.407 – 412, 1998.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology**. 1. ed. Spain: Wolfe, 1994. 648p.

- RADOSTITS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. **Herd health. Food Animal Production Medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders , 1994. 631p.
- RENEAU, J.K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. **Journal Dairy Science**, v.69, p.1708 – 1720, 1986.
- ROMVARY, A., SZITA, G., CSIKO, G., GASPARG, Z., GASPARG, I. Effectiveness of na intramammary infusion with no antibiotics. IV. Innocuity test of new intramammary infusion. **Magyar Allatorvosok Lapja**, v.48, n.8, p.493-497, 1993.
- ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. São Paulo: Guanabara, 1993. 420p.
- SALMON, H. The intestinal and mammary immune system in pigs. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v. 17, p. 367 – 388, 1987.
- SANTOS, C.R., ARAÚJO, G.L., CARVALHO, E.S., SHARAPIN, N., ROCHA, L.M., TEIXEIRA, L.A. Controle de qualidade físico-químico e biológico de tinturas de própolis. **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.35, 1999.
- SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.130, n.5, p.199-204, 1957.
- SCHOLLENBERGER, A., DEGORSKI, A., FRYMUS, T. Cells of sow mammary secretions I morphology and differential counts during lactation. **J. Vet. Med**, v.33, p.31 – 38, 1986.
- SEIXAS, F.R.M.S., PEREIRA, A.S., RAMOS, M.F.S., NETO, F.R.A. Composição química da própolis brasileira das regiões sul e sudeste. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas, M.G, **Livro de Resumos...** Poços de Caldas, Editora, 2000.v.2, PN-050.
- SFORCIN, J.M. Efeito imunoprotetor da própolis. **Revista da Universidade de Franca**, v.7, n.7, p.17, 1999.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.
- SILVA, W.P., DESTRO, M.T., LANDGRAF, M., FRANCO, B.D.M. Biochemical characteristics of typical and atypical Staphylococcus aureus in mastitis milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of microbiology**, v.31, p.103 – 106, 2000.
- SMITH, B. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. São Paulo: Manole, v.2, p. 1041-1056. 1994.

- SOARES, J.D.M., CITÓ, A.M.G., LOPES, J.A.D., CHAVES, M.H. Triterpenos isolados de própolis piauiense. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas, M.G. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas: Editora, 2000, v.2, PN-054.
- SOUSA, M.L., BASTOS, J.K.I. Isolamento de alguns componentes da própolis. **Revista da Universidade de Franca**, v.7, n.7, p.40, 1999.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS User's Guide**: Statistics version 6, fourth edition. Cary: SAS Institute Inc., 1990. 1686p.
- TAKAISI-KIKUNI, N.B., SCHILDER, 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, p.222-227, 1994.
- VARGAS, A.C., POCAI, E.A., FONTANA, F.Z., BORSA, A., STULP, S.L. Dados parciais do teste *in vitro* da atividade antibacteriana da própolis. In: Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, I & Congresso Estadual de Medicina Veterinária, XII. **Anais...** Porto Alegre: SOVERGS. 160p. 1994.
- WAAGE, S., MORK, T., ROROS, A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.4, p.712 – 719, 1999.
- WALKER, P., CRANE, E. Constituents of Propolis. **Apidologie**, v.18, n.4, p.327-334, 1987.
- WATTIAUX, M.A. **Lantancia y ordeno**. 1996. Endereço eletrônico: <http://babcock.cals.wisc.edu/des/lac5/mastitis.html> #Heading 2.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1A – Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite clínica tratadas com formulação de própolis

Animal	Colheitas				
	Antes do tratamento	24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
1	2.990.750	7.348.700	9.570.400	3.674.350	2.307.150
2	3.076.200	3.845.250	8.117.750	5.041.550	2.221.700
3	7.775.950	6.066.950	3.076.200	2.392.600	1.110.850
4	7.946.850	5.810.600	8.045.522	6.921.450	4.016.150
5	10.339.450	5.896.050	4.528.850	7.519.600	5.041.550
6	9.655.850	1.110.850	769.050	9.279.400	6.921.450
7	9.228.600	5.896.050	5.468.800	2.392.600	1.452.650
8	5.297.900	4.101.600	1.110.850	939.950	598.150
9	8.117.750	3.759.800	1.452.650	4.187.050	3.332.550
10	3.332.550	2.734.400	1.794.450	939.950	598.150
11	3.418.000	2.905.300	1.452.650	1.367.200	769.050
12	3.204.358	1.922.272	1.345.590	807.354	645.883
13	4.144.325	3.315.460	2.320.822	1.624.575	974.745
14	3.033.020	2.123.114	1.698.491	1.019.094	560.501
15	5.127.030	3.076.218	2.460.974	1.722.681	430.670
Média	5.779.239	3.994.174	3.547.537	3.321.960	2.065.413

Tabela 2A – Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite clínica que receberam o veículo (DMSO)

Animal	Colheitas				
	Antes do tratamento	24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
16	2.822.451	4.957.017	8.023.717	7.921.582	7.533.075
17	3.128.008	5.045.147	8.237.002	7.875.134	7.025.128
18	4.144.325	5.926.384	8.948.839	7.606.513	6.693.731
19	5.383.351	6.083.318	7.360.814	6.698.340	6.229.952
20	6.152.403	6.952.212	8.690.265	7.647.433	7.212.920
21	2.975.522	4.314.506	6.601.194	5.907.164	5.080.161
22	3.483.388	5.259.915	6.627.492	5.898.467	5.190.651
23	4.102.901	6.072.293	8.441.487	7.428.508	6.871.369
24	4.748.837	7.313.209	8.702.618	7.614.401	6.437.168
25	3.051.765	4.516.712	6.052.394	5.235.321	4.724.877
Média	3.999.295	5.644.071	7.768.582	6.983.286	6.299.903

Tabela 3A – Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite subclínica tratadas com formulação de própolis

Animal	Colheitas				
	Antes do tratamento	24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
26	854.500	1.196.300	823.051	512.721	341.803
27	831.574	1.110.850	688.014	598.151	427.250
28	939.950	1.281.750	769.050	341.800	256.350
29	710.944	1.156.009	789.558	427.250	341.800
30	933.114	1.548.969	939.950	767.011	418.009
31	799.812	1.281.750	1.025.400	512.700	314.058
32	902.032	1.196.300	769.050	598.150	281.130
33	854.500	1.623.550	1.367.200	820.327	228.128
34	638.278	893.589	643.390	534.013	209.727
35	534.053	870.506	504.893	353.425	215.589
Média	799.876	1.215.957	831.956	546.555	303.384

Tabela 4A – Número de células somáticas por mililitro de leite, em vacas com mastite subclínica que receberam o veículo (DMSO)

Animal	Colheitas				
	Antes do tratamento	24h após a primeira aplicação	48h após a primeira aplicação	96h após a primeira aplicação	216h após a primeira aplicação
36	769.050	640.875	598.150	465.838	582.298
37	726.325	530.217	512.713	256.350	640.875
38	555.425	502.446	442.152	427.250	606.695
39	504.931	439.289	382.181	259.883	597.731
40	612.824	536.221	498.685	437.346	648.290
41	558.103	496.711	434.622	358.622	616.829
42	476.135	412.238	387.504	373.941	749.123
Média	600.399	508.285	465.144	368.461	634.549

ANEXO B

Tabela 1B – Análise de variância do número de células somáticas presentes no leite de vacas com Mastite Clínica em função da aplicação de Própolis e DMSO nos quatro períodos de coleta.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	P-value
Tratamento	1	24.66664265	0,0001
Erro (a)	23	0.90687279	-
Amostra	3	0.93673100	0,0043
Amostra*tratamento	3	1.11308623	0,0015
Erro (b)	69	0.19506	-
Total	99	-	-

Tabela 2B – Análise de variância do número de células somáticas presentes no leite de vacas com Mastite Subclínica em função da aplicação de Própolis e DMSO nos quatro períodos de coleta.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	P-value
Tratamento	1	1.10842848	0,0001
Erro (a)	15	0.11628820	-
Amostra	3	1.32835489	0,0001
Amostra*tratamento	3	2.08495191	0,0001
Erro (b)	45	0.029485	-
Total	67	-	-