

MARCELO SOUZA PINTO

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE PRÓPOLIS VERDE DO
ESTADO DE MINAS GERAIS SOBRE BACTÉRIAS ISOLADAS DO
LEITE DE VACAS COM MASTITE**

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
2000**

Ao meu Pai, Aloísio, pelo constante incentivo, apoio e sabedoria.

À minha Mãe, Joselita, pelo o que sou hoje.

Às minhas Irmãs, Marla Carolina e Mayara, pelo carinho.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida, pela saúde e pela força.

Aos meus grandes amigos, que não são poucos, pela eterna amizade, convívio e incentivo.

Aos animais, razão maior do profissional Médico-Veterinário.

Ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Professor José Eurico de Faria pela paciência, amizade, orientação, ensinamentos, incentivo, compreensão, idéias e sugestões.

Ao Professor Dejair Message, pela valiosa co-orientação, incentivo, atenção dispensada, idéias e sugestões.

Ao Professor Sérgio Túlio Alves Cassini, pela valiosa co-orientação, pela importante ajuda no início do experimento, idéias e sugestões.

À Professora Carmen Silva Pereira, do Departamento de Zootecnia, pelas orientações relacionadas com a estatística do experimento.

Ao Sr. Ademar Jesus de Carvalho, proprietário do Sítio dos Chaves, inventor do sistema CPI, Coletor de Própolis Inteligente, que gentilmente nos cedeu a amostra de própolis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo, pela hospitalidade e boa vontade em nos ceder o laboratório e equipamentos para a realização de etapas do experimento.

Ao Professor Marco Antônio pela grande ajuda e organização durante as sessões de fotografia.

Ao Professor Eldo Antônio Monteiro da Silva, pela enorme boa vontade em nos ceder o laboratório para a realização das fotografias.

Aos colegas de curso, Alessandra, Ana Elisa, Antônia, Carla, Fabienne, Moema, Nara, Regina, Rosângela, Roueda, Waneska, Almir, José Gomes, Marco Túlio, Paulo Martins e Ricardo Portela, pelo convívio alegre e grandes amizades.

À acadêmica do curso de Medicina Veterinária, Marilú Gioso, pela boa vontade em ajudar na realização do experimento.

À colega de curso, amiga e companheira de assunto Roueda, pela troca de idéias, pela boa vontade, pela força e pelo largo sorriso de todos os dias.

Aos colegas e funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária da UFV, Renato Dale, Luiz Carlos da Silva, Paulo Fernando Monteiro, Marcos Salgado Filho, Élcio Tadeu Galvão, Antônio Carlos Batalha e Ademir Alves, pelo grande apoio dado na preparação de material, meios de cultura, reagentes e análises realizadas.

Ao Professor Pacífico Antônio D. Belém, Coordenador do Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, pela ajuda e constante empenho na busca de melhorias do curso e condições de trabalho dos estudantes.

À Técnica do Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Veterinária da UFV, Maria Lucinda Fonseca, pelo empréstimo de equipamentos importantes.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARCELO SOUZA PINTO, filho de Aloísio da Silva Pinto e Joselita Souza Pinto, nasceu em 03 de dezembro de 1974, na cidade do Rio de Janeiro, R.J.

Ingressou no Colégio Universitário (COLUNI), da Universidade Federal de Viçosa, em 1989, tendo concluído o segundo grau científico em 1991.

Em março de 1993, iniciou o curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa obtendo o título de Médico-Veterinário em dezembro de 1997.

Iniciou-se na pesquisa, como bolsista de iniciação científica, em fevereiro de 1996, prosseguindo até dezembro de 1997, sempre na área de Medicina Veterinária Preventiva.

Em março de 1998 iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2000.

CONTEÚDO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Mastite bovina	5
3.1.1. Importância	6
3.1.2. Etiologia e tratamento	7
3.2. Própolis	12
3.2.1. Definição	12
3.2.2. Composição química	13
3.2.3. Atividades terapêuticas da própolis	19
3.2.4. Atividade antibacteriana da própolis	21
3.2.4.1. Possíveis mecanismos de ação da atividade antibacteriana da própolis	21
3.2.4.2. Relatos de estudos da atividade antibacteriana da própolis sobre diferentes espécies	22

3.2.5. Própolis e mastite	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Local	33
4.2. Identificação de vacas com mastite	33
4.3. Colheita das amostras de leite	34
4.4. Isolamento e identificação das espécies bacterianas	34
4.5. Identificação presuntiva dos microrganismos	35
4.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.5.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	35
4.5.3. Coliformes	36
4.6. Obtenção da amostra de própolis	36
4.7. Processamento da própolis e avaliação da atividade antibacteriana dos extratos obtidos através de fracionamento em diferentes solventes	36
4.7.1. Obtenção dos extratos de própolis (extração seqüencial)	36
4.7.2. Técnica do antibiograma em discos de papel de filtro com sobrecamada de meio de cultura	37
4.8. Determinação da curva de sobrevivência bacteriana frente aos extratos etanólicos de própolis	38
4.8.1. Preparo dos extratos etanólicos	38
4.8.2. Diluição dos extratos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP-95) em tubos contendo caldo BHI	39
4.8.3. Determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), em meio de “Plate Count Agar (PCA)”	40
4.9. Análise estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Análise da atividade antibacteriana dos diferentes extratos (frações) de própolis	43
5.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	45
5.1.2. <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativos	48
5.1.3. <i>Streptococcus agalactiae</i>	49
5.2. Análise da curva de sobrevivência bacteriana frente aos extratos etanólicos de própolis	51
5.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	61

5.2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	63
5.3. Considerações finais	65
6. RESUMO E CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICES	78
APÊNDICE A	79
APÊNDICE B	83
APÊNDICE C	85
APÊNDICE D	87
APÊNDICE E	89
APÊNDICE F	91

RESUMO

PINTO, Marcelo Souza, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2000.
Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite. Orientador: José Eurico de Faria. Conselheiros: Dejair Message e Sérgio Túlio Alves Cassini.

A sensibilidade, *in vitro*, de amostras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, *Streptococcus agalactiae* e bactérias do grupo dos coliformes isoladas do leite de vacas com mastite a diferentes extratos de própolis, na concentração de 100 mg/mL, foi avaliada pela técnica de antibiograma em discos de papel de filtro com sobrecamada de meio de cultura. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de própolis comercial, os extratos etanólico e, em menor proporção, o metanólico inibiram o crescimento das amostras de bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*. Os extratos obtidos através da água, do acetato de etila e do clorofórmio não inibiram nenhuma amostra bacteriana, assim como, os veículos etanol e metanol puros utilizados como controle. A bactéria Gram negativa testada, do tipo coliforme, não apresentou sensibilidade a nenhum dos extratos. Verificou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) na sensibilidade aos extratos entre amostras bacterianas

de mesma espécie, mas de origens diferentes. Estudou-se o efeito de extratos etanólicos de própolis obtidos por álcool 70, 80 e 95%, sobre amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas do leite de vacas com mastite. Não houve diferença significativa ($p>0,01$) na atividade antibacteriana entre os três tipos de extratos etanólicos de própolis estudados. As duas concentrações de extratos etanólicos utilizadas na avaliação da sensibilidade do *Staphylococcus aureus*, 3,0 e 2,0 mg/mL, inibiram, de maneira semelhante, as três amostras bacterianas testadas. Somente em uma amostra foi observada ação bactericida dos extratos etanólicos de própolis, em ambas as concentrações, a partir de 12 horas de exposição. Nas duas amostras de *Streptococcus agalactiae*, observou-se o efeito bactericida da própolis ao final do período de 24 horas de exposição às concentrações de 0,43 e 0,3 mg/mL. Verificou-se que, com dosagens cerca de dez vezes menores que as aplicadas para *Staphylococcus aureus*, houve uma completa e irreversível inibição do *Streptococcus agalactiae*, dentro do período estudado. Todos estes resultados estimulam o prosseguimento de novas pesquisas sobre a utilização de extratos de própolis, em veículos adequados, com vistas ao tratamento da mastite bovina.

ABSTRACT

PINTO, Marcelo Souza, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2000.
Antimicrobial effect of Minas Gerais State green propolis on bacteria isolated from milk of cows with mastitis. Adviser: José Eurico de Faria.
Committee members: Dejair Message and Sérgio Túlio Alves Cassini.

The sensitivity, *in vitro*, of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negative, *Streptococcus agalactiae* and coliforms strains, isolated from milk of cows with mastitis, to different propolis extracts, at a concentration of 100mg/mL, was evaluated by agar disk diffusion with medium doublelayer technique. The results showed that the commercial propolis, ethanolic extract and, in a minor proportion, the methanolic extract inhibited the growth of the Gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negative and *Streptococcus agalactiae*. The extracts obtained through water, etila acetate and chloroform did not inhibit any bacterial strain nor pure ethanol and methanol vehicles, utilized as control. The Gram negative bacterium tested, from coliform group, did not show sensitivity to any extracts. There were significant differences ($P < 0.05$) in the sensitivity to the extracts between bacterial strains of the same specie, but from different origins. This study shows the effect of ethanolic extracts of propolis obtained by 70, 80 and 95% of ethanol on

Staphylococcus aureus and *Streptococcus agalactiae* strains, isolated from milk of cows with mastitis. There were no significant differences ($P>0.01$) in the antibacterial activity among the three types of ethanolic extracts of propolis. The two concentrations of ethanolic extracts utilized in the sensitivity test of the *Staphylococcus aureus*, 3.0 and 2.0 mg/mL, were similar in the inhibition of the three strains tested. The bactericidal action of the ethanolic extracts of propolis was observed in only one strain, in both concentrations, from 12 hours of exposure. In the two strains of *Streptococcus agalactiae*, the bactericidal effect of propolis was observed at the end of 24 hours of exposure to 0.43 and 0.3 mg/mL concentrations. Dosages at least ten times smaller than those applied to *Staphylococcus aureus* caused a complete and irreversible inhibition of the *Streptococcus agalactiae*, during the studied period. All these results stimulate further research on the use of propolis extracts, using appropriate vehicles in bovine mastitis treatment.

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite nacional é da ordem de 20 bilhões de litros/ano, sendo importada, anualmente, uma quantidade variável para atender o mercado interno de cerca de 2 bilhões de litros nos últimos anos. O rebanho leiteiro dos Estados Unidos, que é de aproximadamente 9 milhões de vacas, é menor do que o brasileiro, mas tem uma produção anual por volta dos 70 bilhões de litros. Esta baixa produtividade determina sérias conseqüências econômicas e sociais, sendo o reflexo de vários fatores como, potencial genético dos animais, manejo inadequado, mão-de-obra não qualificada, baixo nível tecnológico, política econômica ineficiente e problemas sanitários do rebanho, sendo a mastite uma das maiores causas (COSTA, 1999).

Nos últimos 30 anos, a indústria leiteira dos países desenvolvidos vem empregando com sucesso, programas de controle da mastite que visam manter a glândula mamária saudável por meio de, principalmente, medidas preventivas, adoção de princípios rígidos de higiene e tratamentos estratégicos de animais doentes. Os avanços, nesse sentido, são significativos, como exemplificando, pela possibilidade de erradicação do *Streptococcus agalactiae* de rebanhos, regiões ou, até mesmo, de países e a redução significativa da infecção por *Staphylococcus aureus* (BRITO, 1996).

No Brasil e na maioria dos países, o *Staphylococcus aureus* é a causa predominante da mastite bovina (WAAGE et al., 1999). Os estafilococos, especialmente *S. aureus*, são conhecidos por apresentarem grande resistência aos tratamentos convencionais, o que evidencia a importância do desenvolvimento de novas pesquisas sobre o controle da infecção estafilocócica na glândula mamária (FARIA, 1995).

O índice de cura bacteriológica das infecções estreptocócicas pode ser alto, mas as infecções por *Staphylococcus aureus* não são facilmente eliminadas, com frequência, somente 30% dos casos durante a lactação (HILLERTON, 1996; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

A antibioticoterapia é o procedimento mais comumente utilizado no tratamento da mastite bovina, porém a crescente preocupação com a presença de resíduos de antibióticos no leite e o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes têm estimulado a busca por meios alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas.

Nos últimos anos, houve um crescente interesse na utilização de medicamentos de origem natural, obrigando a ciência a se esforçar cada vez mais na busca do desenvolvimento de novas drogas, sempre objetivando adquirir maior eficiência e menor toxicidade. Nesse sentido, os produtos apícolas ganham mais espaço neste contexto e, dentre eles, a própolis, através de seu variado número de atividades biológicas descritas. E ainda, o Brasil, com o crescente desenvolvimento de sua apicultura, exibe uma enorme disponibilidade de própolis, considerada, por muitos especialistas, como uma das melhores do mundo e, por isso, tem sido fonte de estudos por pesquisadores em diversos países.

Muitos trabalhos nacionais e estrangeiros, ilustram a diversidade de atividades biológicas da própolis e, dentre elas, a antibacteriana. A grande maioria dos relatos mostra que os diversos tipos de extratos de própolis possuem acentuada ação inibidora, *in vitro*, sobre gêneros Gram positivos e, em menor escala, sobre as bactérias Gram negativas (BRUMFITT et al., 1990; FUENTES e HERNANDEZ, 1990; GRANGE e DAVEY, 1990; WOISKY et al., 1994;

VARGAS et al., 1994; GOULART, 1995; PARK, et al., 1997; KUJUMGIEV et al., 1999). As reconhecidas capacidades antiinflamatória e imunomodulatória da própolis (DOBROWOLSKI et al., 1991; IVANOVSKA et al., 1995; TATEFUJI et al., 1996; MIYATAKA et al., 1997; MIYATAKA et al., 1998) também servem de estímulo para as investigações acerca de sua utilização em processos inflamatórios, como a mastite, em animais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antibacteriano de diferentes frações de própolis frente a bactérias patogênicas isoladas do leite de úbere bovino com mastite clínica ou subclínica.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a atividade antimicrobiana das frações da própolis frente a diferentes isolados bacterianos causadores de mastite bovina.

Selecionar as frações de própolis que possuem ação antibacteriana sobre bactérias isoladas de mastite bovina.

Avaliar a curva de sobrevivência de bactérias isoladas de mastite bovina às frações extraídas da própolis, com atividade antimicrobiana.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Mastite bovina

O leite da grande maioria das glândulas mamárias das vacas é estéril e normalmente não se isolam microrganismos, parasitas ou comensais (HILLERTON, 1996). Porém, poderá conter bactérias no momento da ordenha, resultantes da contaminação dos canais lactíferos e da cisterna do úbere (DINIZ, 1997).

A mastite, pode então ser definida como uma inflamação da glândula mamária, causada por diferentes tipos de injúrias, incluindo agentes infecciosos (bactérias e fungos) e suas toxinas, traumas físicos ou químicos irritantes. O termo “mastite” é derivado das palavras gregas *mastos*, que significa “mama ou seio”, e *itis*, que significa “inflamação”(NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

Em vacas leiteiras, a mastite é, invariavelmente, causada por microrganismos, usualmente bactérias, que invadem o úbere pelo canal da teta, se multiplicam nos tecidos produtores de leite e sintetizam as toxinas causadoras imediatas das injúrias. A mastite causada por trauma ou agentes químicos irritantes, na ausência de microrganismos infecciosos, é rara (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

A extensão da resposta inflamatória varia enormemente, de acordo com a natureza do estímulo e da capacidade de resposta do animal. Reações brandas, em razão da fraca estimulação, do reconhecimento deficiente do irritante ou da remoção rápida e eficiente do estímulo, somente são detectáveis por uma investigação mais detalhada (HILLERTON, 1996).

A mastite subclínica pode ser definida quando houver a presença de microrganismos patogênicos no leite capazes de levar a uma contagem de células somáticas (CCS) acima de 500.000 células/mL, sem que sejam notadas alterações no úbere e anormalidades no aspecto do leite, levando à queda da produção nos animais (RADOSTITS et al., 1994; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

Existe um consenso geral entre pesquisadores, clínicos e educadores, a respeito da descrição geral das categorias de mastite clínica. Por exemplo, a mastite clínica mediana denota anormalidades no leite com ou sem sinais de calor, rubor, dor e/ou tumefação no quarto mamário infectado. A mastite aguda refere-se às distintas anormalidades no leite e, ainda, calor, dor, glândula aumentada de volume e sinais sistêmicos como febre, anorexia e queda da produção de leite. Na mastite hiperaguda, os severos sinais sistêmicos aparecem quase sempre antes que as mudanças no aspecto do leite se tornem evidentes. A mastite crônica comumente se refere à persistência e recorrência de mudanças no leite por longos períodos. Ocasionalmente, esses casos crônicos podem evoluir para uma forma mais ativa da doença (RADOSTITS et al., 1994).

3.1.1. Importância

É considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no Brasil e em todo o mundo e aquela que proporciona as maiores perdas econômicas na exploração de bovinos leiteiros. Estima-se que, mundialmente, as perdas anuais causadas pela doença são por volta de 35 bilhões de dólares e, na Argentina, de aproximadamente 221 milhões por ano (GIRAUDO et al., 1997). Nos Estados Unidos, as perdas econômicas são estimadas em aproximadamente

185 dólares/vaca, por ano, o que, multiplicado pelo total de animais (9,5 milhões de cabeças), chega-se a um total de 1,8 bilhões de dólares anuais. Dois terços destas perdas são devido à redução na produção de leite pelas vacas infectadas subclínicamente (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

A diminuição na produção de leite é responsável pela maior parcela do total das perdas, visto que há uma diminuição substancial na produção em vacas infectadas. Incluem-se, ainda, gastos com medicamentos, leite descartado, serviços veterinários, descarte prematuro de animais, diminuição no valor comercial dos animais infectados e interferência no desenvolvimento genético de raças leiteiras (DeGRAVES e FETROW, 1993; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998). Deve-se considerar também, as perdas ocasionadas à indústria de laticínios, devido à queda na qualidade do produto em função das alterações na sua composição química. A lactose, a gordura, os sólidos não gordurosos e a caseína estão reduzidos no leite de vacas com mastite, enquanto há um aumento nos teores de cloreto, sódio, proteínas séricas (albumina e imunoglobulinas), pH e na contagem de células somáticas (CCS) (DeGRAVES e FETROW, 1993).

O aumento na CCS e as mudanças na composição e sabor do leite de vacas infectadas podem reduzir o seu valor para os processadores (laticínios) e a aceitabilidade dos produtos lácteos pelo consumidor. Baixos teores de caseína, a principal proteína do queijo, assim como o pH alcalino do leite de vacas com mastite causam significantes perdas na produção deste derivado do leite (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

3.1.2. Etiologia e tratamento

A mastite é causada por numerosos patógenos, na maioria dos casos por bactérias, mas outros tipos de microrganismos, incluindo leveduras e até algas, ocasionalmente, causam infecções intramamárias. Vírus, raramente, são causa de infecção primária da glândula mamária (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

A maioria das infecções é causada por alguns tipos de bactérias (estafilococos, estreptococos e espécies Gram-negativas). Estes patógenos dividem-se em duas categorias (Tabela 1): bactérias contagiosas, que são aquelas disseminadas de quartos mamários infectados para outros sadios e de vacas infectadas para vacas sadias (animal para animal), e bactérias ambientais, que estão comumente presentes no meio ambiente do animal e podem alcançar o esfíncter da teta por contato desta com fezes, solo, água e camas contaminadas (ambiente para animal). Esta distinção tem importância prática porque diferentes medidas de controle são necessárias para os diferentes grupos de microrganismos (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

O princípio básico do controle da mastite é prevenir as infecções o quanto for possível. Apesar da utilização de excelentes métodos preventivos, algumas novas infecções ainda ocorrem. Poucas vacas podem eliminar a infecção espontaneamente, enquanto que, em outros casos, é requerido o descarte dos animais ou o uso de terapias com drogas (PHILPOT e NICKERSON, 1997).

A terapia deve atuar na eliminação dos patógenos invasores e/ou reduzir as conseqüências fisiopatológicas da infecção (sintomas e lesões) sem prejudicar as defesas do animal (PHILPOT e NICKERSON, 1997).

O tratamento medicamentoso ideal da mastite seria aquele que pudesse controlar todos os processos infecciosos do úbere sem deixar resíduos no leite (COSTA, 1999).

A adoção da antibioticoterapia para a mastite deve visar a eficácia terapêutica e benefícios econômicos, tanto do ponto de vista do aumento da produção como na redução das fontes de infecção (quartos infectados). A terapia tem por meta a eliminação das infecções preestabelecidas e, para tanto, é necessário que o antimicrobiano atinja concentrações no úbere maiores ou pelo menos iguais à concentração inibitória mínima (MIC) para os principais patógenos da mastite (COSTA, 1999).

Tabela 1 - Bactérias causadoras de mastite bovina

Bactérias Contagiosas	Bactérias do Meio Ambiente
<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> spp. Coagulase (-)	<i>Enterobacter</i> spp.
	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	<i>Streptococcus equinus</i>
	Outros estreptococos (<i>Streptococcus</i> spp.)
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998.

A eficácia clínica de um antibiótico é muito difícil de quantificar porque a reinfecção é comumente confundida como falha do tratamento. Existem grandes variações na resposta a um tratamento para mastite de vaca para vaca e entre rebanhos. Esta variação é devida ao tipo de bactéria envolvida, localização dos sítios infectados na glândula mamária, a severidade da tumefação da glândula, a cronicidade da infecção e outros fatores (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998). Sempre que possível, o tratamento com antimicrobianos deve ser selecionado com base em testes de sensibilidade, uma vez que um medicamento não age da mesma forma contra todos os microrganismos. Entretanto, verifica-se na atualidade que, apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, o problema da resistência dos microrganismos a estes medicamentos acentuou-se pelo uso indiscriminado e inadequado, sobretudo no Brasil (COSTA, 1999).

Segundo vários autores, a terapia com antibiótico 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; HILLERTON, 1996; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998; COSTA, 1999; WAAGE et al., 1999). Também deve ser entendido que somente o tratamento da mastite clínica não irá reduzir a prevalência da doença no rebanho, se não for acompanhado por todas as partes que compõem um bom programa de controle de mastite (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

Um dos motivos pelos quais as taxas de cura das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são baixas, se deve às peculiaridades da patogênese deste agente invasor. Após danificar os tecidos da superfície das cisternas no interior do úbere, as bactérias migram pelo sistema de ductos da glândula, vindo a estabelecer focos profundos de infecção nos alvéolos secretores. A seguir, o sistema imunológico do animal, tentando manter a bactéria num mesmo local, faz o isolamento da área afetada através dos leucócitos e tecido conjuntivo fibroso, o que leva à formação de abscessos e a perda de função da parte afetada. Periodicamente, a bactéria pode romper a barreira e infectar tecidos saudáveis adjacentes, iniciando novamente o ciclo de infecção. Assim, se caracterizam as infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas e com baixas taxas de cura (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

O *Staphylococcus aureus* também é conhecido por apresentar maiores índices de resistência para penicilina, ampicilina e estreptomicina. A maior resistência observada para penicilina, possivelmente, está relacionada à capacidade do *Staphylococcus aureus* de produzir a enzima penicilinase, que inativa o antibiótico (VESTWEBER e LEIPOLD, 1993).

O Tabela 2 ilustra trabalho recente realizado no Brasil, à respeito da prevalência de estirpes bacterianas mais comuns na etiologia da mastite bovina e resistentes aos antibióticos de uso comum para o tratamento da doença. Mais uma vez, são dados que justificam a preocupação em buscar meios alternativos para o tratamento desta importante doença.

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

Fonte: COSTA, 1999.

Ainda deve-se ressaltar, que os resíduos de antibióticos no leite de consumo representam riscos à saúde pública e interferem na produção dos derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes. Os riscos à saúde do consumidor são representados por reações alérgicas, frequentemente associadas aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilina), que podem até mesmo desencadear choque anafilático em indivíduos sensíveis. Além das reações alérgicas, têm-se relatado discrasias sangüíneas decorrentes de certos antimicrobianos como o cloranfenicol, que inclusive já é de uso proibido no tratamento de mastite nos Estados Unidos (COSTA, 1999).

3.2. Própolis

3.2.1. Definição

A própolis se constitui numa série de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, de consistência viscosa, recolhida de certas partes dos vegetais, como brotos e cascas de árvores ou de outras partes do tecido vegetal, pelas abelhas, que a transportam até à colmeia, onde adicionam e modificam sua composição, através de secreções próprias como a cera e secreções salivares essenciais ou, ainda, seria resultante do processo de digestão do pólen pelas abelhas (CIZMARIK et al., 1975; GHISALBERTI, 1979). Possui como descrição física e características sensoriais: aroma característico (balsâmico e resinoso), dependendo da origem botânica, cor variável desde a amarelada, parda, esverdeada clara ao pardo escuro, sabor de suave balsâmico a forte, amargo e picante e consistência maleável à ligeiramente rígida, à temperatura ambiente, e rígida em temperaturas abaixo de 20° C (APACAME, 1999).

As virtudes curativas da própolis são conhecidas desde os tempos mais remotos. Era bastante conhecida, no Antigo Egito, pelos sacerdotes que dominavam a medicina, a química e a arte da mumificação de cadáveres (MAKASHVILI, 1975). Também era conhecida dos Antigos Gregos, o que inclusive explica a origem do seu nome, que provém do resultado da combinação

de dois termos: “Pró”, que significa antes, e “Polis”, que quer dizer cidade. Isso se deve ao fato de a própolis ser observada na entrada da colmeia, relacionando-se então com a defesa da “cidade” das abelhas (NIKOLAEV, 1975; GHISALBERTI, 1979; HOFFMANN et al., 1998; DANTAS et al., 2000).

Constitui-se num material de construção, reparação, isolamento e proteção que as abelhas utilizam na colmeia para diversos fins, tais como, tapar rachaduras, de modo que a colmeia fique hermeticamente fechada para impedir a entrada de visitantes indesejáveis e permitir o melhor isolamento térmico possível, recobrir totalmente pequenos animais e insetos invasores que as abelhas não conseguem retirar da colmeia, constituindo numa espécie de embalsamento que se opõe a qualquer processo de decomposição pútrida (GHISALBERTI, 1979; DONADIEU, 1980). E ainda, os constituintes voláteis da própolis reduzem também a aeroflora no interior da colmeia (PEPELJNJAK et al., 1985).

3.2.2. Composição química

A própolis é composta, em média, por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (IOIRISH, 1975; NIKOLAEV, 1975; GHISALBERTI, 1979; GRANGE e DAVEY, 1990; BONVEHI et al., 1994).

Possui uma composição química complexa, contendo mais de 160 componentes e, dentre os compostos químicos identificados, podem ser citados os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), chalconas, ácido benzóico e derivados, benzaldeídos, álcoois, cetonas, fenólicos, heteroaromáticos, álcool cinâmico e derivados, ácido cafeico e derivados, ácidos diterpenos e triterpenos, minerais e outros (WALKER e CRANE, 1987; BONVEHI et al., 1994; MARCUCCI, 1995; BANKOVA et al., 1998; SEIXAS et al., 2000; SOARES et al., 2000).

A maioria dos dados acerca da composição química da própolis é oriunda de países da zona temperada, e relatam o grupo dos fenólicos como sendo o mais importante constituinte, que corresponderiam a mais de 50% do

peso da própolis (BANKOVA et al., 1996). Muitos dos componentes fenólicos pertencem a três grupos estruturais: flavonóides agliconas, ácidos fenólicos e seus ésteres (BANKOVA et al., 1992).

Entre as substâncias isoladas, preponderam os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), como uns dos principais responsáveis pelas atividades antiviróticas, antiparasitárias, antibacterianas, antioxidantes e demais propriedades farmacológicas observadas na própolis (GRANGE e DAVEY, 1990; BONVEHI et al., 1994; LANGONI et al., 1994; BANKOVA et al., 1995). As vitaminas B₁, B₂, B₆, C, E e minerais como, manganês, ferro, cálcio, alumínio também já foram identificados em amostras de própolis (MARCUCCI, 1995), assim como os açúcares arabinose, frutose, glicose, sacarose e maltose (BONVEHI et al., 1994).

As abelhas modificam a composição original da resina da planta misturando-as com secreções das glândulas hipofaríngeas, especialmente β -glicosidases. Os flavonóides heterosídeos são hidrolisados para a forma de agliconas livres, o que aumenta a ação farmacológica destes compostos (BONHEVI et al., 1994; PARK e IKEGAKI, 1998).

Dentre os flavonóides mais encontrados e estudados na própolis, podem ser citados, a pinocembrina, galangina, acacetina, apigenina, quercetina, rutina, rhamnetina, chrisina e vanilina (BANKOVA et al., 1982; BONHEVI et al., 1994; MATTOS et al., 1999). Foi encontrada uma concentração de pinocembrina e galangina, dois dos flavonóides com reconhecida atividade antimicrobiana, superior a 50% do conteúdo total de flavonóides presentes na amostra de própolis estudada (BANKOVA et al., 1982).

Existem variações sazonais na composição química da própolis, como relatado por BANKOVA et al. (1998), que observaram algumas diferenças na composição química de amostras de própolis colhidas de um mesmo local, só que em épocas do ano distintas. Foi verificado que o decréscimo de alguns componentes biologicamente ativos, como ácidos fenólicos, é acompanhado por um aumento de outros, como por exemplo, os ácidos diterpênicos. As subespécies de abelhas *Apis mellifera*, Européia ou Africana, também parecem

influenciar a composição quantitativa da própolis.

Amostras de própolis colhidas de regiões diferentes (Sul e Sudeste do Brasil) e produzidas por variedades diferentes de abelhas *Apis mellifera* mostraram possuir quantidades diferentes de certos flavonóides na forma de agliconas em suas composições. A amostra proveniente do Estado de São Paulo, cuja variedade de abelha é de origem africana, mostrou possuir um conteúdo total de flavonóides de 48,46 mg/g de própolis e altas concentrações de galangina e chrisina, a amostra do Rio Grande do Sul, colhida em colmeias de abelhas de origem européia, continha 23,71 mg de flavonóides totais por grama de própolis e maiores quantidades de kaempferol e sakuranetina. (KOO e PARK, 1997).

Segundo MARCUCCI et al. (1999b), na própolis brasileira, os ácidos fenólicos são mais abundantes que os flavonóides, sendo os principais encontrados, o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e o ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano. Foi isolada pela primeira vez, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), uma substância fenólica na própolis brasileira, como sendo o p-hidroxibenzoato de metila, conhecido como metilparabeno, usado como conservante para comidas, bebidas e cosméticos (MARCUCI et al., 1999b).

BANKOVA et al. (1995), estudando 4 amostras diferentes de própolis brasileira e comparando-as com uma amostra européia, concluíram que a própolis brasileira é caracterizada por uma baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos. Altas concentrações de ácido dihidrocinâmico, a presença de acetofenonas e alguns terpenóides específicos são característicos da própolis brasileira. Tais resultados confirmam a sugestão de que a composição da própolis brasileira é substancialmente diferente da encontrada em própolis de regiões temperadas, devido às diferentes fontes de plantas.

Analisando diferentes amostras de própolis brasileiras, WOISKY e SALATINO (1998) também encontraram um baixo conteúdo de flavonóides, às vezes traços insignificantes, se comparado com a maioria dos relatos sobre análises de própolis, em geral de regiões temperadas. A mesma situação também foi verificada por SEIXAS et al. (2000).

O termo cera é comumente aplicado para misturas de compostos apolares de cadeia longa encontradas na superfície de plantas e animais. Um estudo da cera de própolis brasileira mostrou que grande parte dos compostos biologicamente ativos, presentes no extrato metanólico de própolis, podem ficar retidos nesta fração. Os álcoois triterpênicos e os ácidos fenólicos mais comuns na própolis brasileira foram detectados através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (NEGRI et al., 1999b).

Um grande número de substâncias têm sido encontradas nas amostras de própolis: ceras, resinas, bálsamos, óleos aromáticos, pólen e outras substâncias orgânicas (MARCUCCI, 1995). Segundo BONVEHI et al. (1994), os compostos fenólicos são a parte mais representativa da resina e fração balsâmica.

Dois novos compostos derivados do ácido cinâmico entre 21 compostos já conhecidos, incluindo 5 flavonóides, 3 compostos fenólicos e 8 derivados do ácido cinâmico, foram isolados de amostras de própolis brasileira (TAZAWA et al., 1998).

Devido à diversificada atividade biológica e ao crescente aumento do interesse da indústria farmacêutica, o conhecimento da composição qualitativa e quantitativa dos flavonóides da própolis é de grande importância para padronização de drogas, assim como para qualquer investigação sobre estes valiosos constituintes (BANKOVA et al., 1982).

Ao contrário da própolis de regiões temperadas, onde o “choupo” (*Populus* sp.) é sua única fonte, no Brasil há uma maior diversidade de plantas que as abelhas podem adotar como fonte de própolis e em diferentes regiões. Assim, sua composição química pode diferir entre uma amostra e outra. No entanto, o critério de escolha das plantas a serem utilizadas como fonte de própolis, pelas abelhas, continua desconhecido (BANKOVA et al., 1995; BANKOVA et al., 1998).

A grande dificuldade para a padronização de sua composição provém de variações que fatores como localidade, época do ano e clima exercem sobre as plantas visitadas pelas abelhas e, conseqüentemente, sobre a constituição da própolis (CHENG e WONG, 1996).

Além da variabilidade na composição da própolis brasileira, o uso indiscriminado de preparações à base de própolis, no Brasil, tem preocupado pesquisadores, pois não existe na atualidade, nenhum controle de qualidade relativo a preparações feitas com este produto natural. Existe também uma preocupação em averiguar com maior profundidade os componentes presentes na própolis brasileira (KOO e PARK, 1997; NEGRI et al., 1999a).

Dependendo do tipo de solvente empregado na extração ou mesmo das condições utilizadas no processo, haverá maior ou menor eficiência de extração das substâncias fenólicas, nas quais concentra-se a maior parte da atividade farmacológica da própolis (MARCUCCI et al., 1999a). O uso de álcool hidratado a 70% na extração da própolis resulta em extratos com maior conteúdo de substâncias fenólicas que no caso de extração com álcool absoluto, embora não tenha sido notado diferença na produção de flavonóides entre os dois tipos de solventes. O álcool absoluto extrai parte da cera, enquanto que a extração pela solução hidroalcoólica a 70% resulta numa tintura livre de cera (WOISKY e SALATINO, 1998).

PARK et al. (1998) fizeram um estudo sobre vários tipos de preparações de extratos de própolis e suas atividades biológicas e aplicações. Por análise através da CLAE, foi observado que no extrato aquoso não foram detectados picos de flavonóides, exceto traços de quercetina e pinocembrina, havendo um aumento da quantidade de picos formados à medida que se aumentava a concentração de álcool ao solvente extrator. Foi verificado que a maioria dos flavonóides identificados (quercetina, acacetina, kanferide, isoramnectina, pinocembrina) foram extraídos nas porcentagens etanólicas entre 60 e 80%. Fato esse também comprovado pela maior porcentagem de inibição do crescimento microbiano proporcionado pelos extratos etanólicos de própolis a 60, 70 e 80%, havendo porém um decréscimo nesta atividade nas porcentagens mais altas de etanol (90 e 95%). A atividade antioxidante existiu em todos os extratos, no entanto, os extratos de própolis a 70 e 80% de etanol apresentaram a maior atividade, seguido pelos extratos etanólicos nas concentrações de 90, 60, 50 e 40% respectivamente. Os extratos que apresentaram menor atividade

antioxidante e nenhuma atividade antimicrobiana foram os extratos etanólicos a 20 e 10% e o extrato aquoso de própolis.

Em trabalho semelhante, PARK e IKEGAKI (1998) encontraram importantes variações na quantidade de flavonóides extraídos por diferentes tipos de solventes. Foi verificado que a maior parte de isosakuranetina, quercetina e kaempferol foi extraída por extratos de própolis a 60% de etanol, enquanto que o extrato etanólico a 70% extraiu mais pinocembrina e sakuranetina e o extrato de própolis a 80% continha maiores quantidades de kaempferide, acacetina e isorhamnetina.

Tentando investigar, através da CLAE, estas possíveis variações no conteúdo fenólico das amostras de própolis brasileira, NEGRI et al. (1999a) empregaram diferentes solventes na extração da resina para a produção e elaboração de um licor à base de própolis. Constataram, então, que o etanol e o propilenoglicol dissolveram melhor os compostos fenólicos existentes nas 10 diferentes amostras de própolis analisadas. Os outros solventes utilizados no estudo, a água e o glicerol, por não solubilizarem os compostos fenólicos, foram considerados como não apropriados para a elaboração do licor.

Segundo DANTAS et al. (2000), o uso de sistemas microemulsionados surge como uma alternativa na solubilização da própolis durante a preparação de pomadas, cremes e géis pela indústria farmacêutica. Pois, a utilização do álcool para solubilizá-la, devido à insolubilidade da própolis em água, leva ao produto um gosto desagradável, tornando-o inconveniente para uso em ferimentos e ainda, um aumento do custo final. Os autores concluíram que podem ser produzidos sistemas microemulsionados com quantidades de água oscilando entre 60 e 76% sendo, portanto, de grande valia na obtenção de formulações farmacêuticas.

Parece que as prováveis fontes de própolis no Brasil, dependendo da região, seriam as plantas, *Baccharis* spp. (alecrin) e *Fluorensia* spp., juntamente com *Clusia minor*, *Clusia major* e *Araucaria heterophylla* (BANKOVA et al., 1995; BANKOVA et al., 1998; BANSKOTA et al., 1998).

3.2.3. Atividades terapêuticas da própolis

Embora, num primeiro momento, os estudos sobre a própolis foram extensivamente realizados nos países do Leste Europeu, o que faz com que muitos dos trabalhos não sejam acessíveis à maioria dos leitores, muitos pesquisadores, em todo o mundo, têm recentemente investigado as diversas atividades biológicas de diferentes extratos e seus componentes, descobrindo e estudando as mais diversas ações farmacológicas. O Tabela 3 mostra alguns dos estudos realizados.

A caracterização destas propriedades biológicas, juntamente com o crescente estímulo da utilização de produtos naturais, têm resultado no aumento da demanda de própolis e seus derivados, como extratos etanólicos, tabletes, cápsulas, sprays ou pomadas (MENEZES et al., 1997).

Embora relatos de reações alérgicas não sejam incomuns, a própolis é relativamente atóxica. Não apresentou nenhum efeito tóxico em um estudo realizado com 90 camundongos, aos quais foram administrados própolis na dosagem de 1400mg/kg peso vivo, ao dia (BURDOCK, 1998).

O ácido cafeico feniletil éster (CAPE) é outro constituinte da própolis com importante atividade biológica. Atua, preferencialmente, inibindo o crescimento, a proliferação e matando linhagens de células oncogenicamente transformadas e tumorais. Também é atribuída ao CAPE a capacidade de induzir a diferenciação e modulação da expressão de antígenos associados a tumor, pelas células (CHENG e WONG, 1996).

Em outro estudo, investigou-se a ação imunomodulatória de um derivado hidrossolúvel da própolis (Water Soluble Derivative - WSD), natural da Bulgária. DIMOV et al. (1991) mostraram, em infecções experimentais por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, em camundongos, que o WSD estimulou macrófagos peritoniais a produzirem a interleucina -1. No entanto, o WSD falhou na desencadeação da proliferação de linfócitos. Tal fato sugere que o WSD aumenta a defesa não específica do hospedeiro por ativação de macrófagos.

Tabela 3 - Relação de alguns estudos sobre as diversas atividades terapêuticas da própolis

ATIVIDADE OBSERVADA	EXTRATO ORIGEM/TIPO	REFERÊNCIA
Antiviral	França/ Etanólico	AMOROS et al. (1992a)
	França/ Etanólico	AMOROS et al. (1992b)
	Alemanha/ Etanólico	HEINZE et al. (1998)
Antifúngica	Cuba/Aquoso e Etanólico	VALDES et al. (1987)
	Polônia/ Tabletes	DOBROWOLSKI et al. (1991)
	Brasil/ Etanólico	HOFFMANN et al. (1998)
Antiprotozoário	Polônia/ Tabletes	DOBROWOLSKI et al. (1991)
	Sigma®/ Etanólico e Dimetilsulfóxido	HIGASHI e CASTRO (1994)
	Sigma®/Aquoso e Etanólico	CASTRO e HIGASHI (1995)
	Brasil/Aquoso	MORONI et al. (1999)
Antioxidante	Polônia/ Etanólico	KROL et al. (1990)
	Brasil/ China/ Japão/ EUA/ Metanólico	YAMAUCHI et al. (1992)
	Brasil/Aquoso e Metanólico	MATSUSHIGE et al. (1996)
	Brasil/ Aquoso	MATSUNO et al. (1997)
Hepatoprotetora	Brasil/ Aquoso	SAID (1998)
Antitumoral	Brasil/ Aquoso	MATSUNO et al. (1997)
Imunomodulatória	Bulgária/ Aquoso	IVANOVSKA et al. (1995)
	Brasil/ Aquoso	TATEFUJI et al. (1996)
	Brasil/ China/Japão Aquoso e Etanólico	MIYATAKA et al. (1998)
Antiinflamatória	Polônia/ Tabletes	DOBROWOLSKI et al. (1991)
	Brasil/ China/Japão Aquoso e Etanólico	MIYATAKA et al. (1997)
Analgésica	Brasil/ Etanólica	MARCUCCI et al. (1999c)
	Brasil/ Etanólico	OKUYAMA et al. (1999)
Broncodilatadora	Brasil/ Etanólica	MARCUCCI et al. (1999c)
Cicatrizante	Brasil/Etanólico	DAMIAN et al. (1999)
Outras	Brasil/Aquoso e Metanólico	MATSUSHIGE et al. (1996)
	Brasil/ Compostos identificados	RAICHASKI et al. (1999)

3.2.4. Atividade antibacteriana da própolis

3.2.4.1. Possíveis mecanismos de ação da atividade antibacteriana da própolis

Sugere-se que o extrato etanólico de própolis tem efeito bactericida causado pela presença de ingredientes muito ativos, porém, lábeis. Este efeito bactericida é dependente da espécie bacteriana em questão, sendo efetivo contra bactérias Gram positivas e para algumas espécies de bactérias Gram negativas (FUENTES e HERNANDEZ, 1990; GRANGE e DAVEY, 1990; WOISKY et al., 1994; VARGAS et al., 1994; GOULART, 1995; PARK et al., 1997; MIRZOEVA et al., 1997).

Segundo estudo realizado por MIRZOEVA et al. (1997), a própolis e alguns de seus componentes possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana interna bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana. Como o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana é essencial para a bactéria, por manter a síntese de ATP, o transporte através da membrana plasmática e a motilidade, tal efeito pode, conseqüentemente, contribuir muito sobre toda a ação citotóxica da própolis, podendo ainda diminuir a resistência das células a outros compostos antibacterianos. Este fato pode explicar a ação sinérgica entre própolis e alguns antibióticos.

A própolis ainda causa uma inibição dose-dependente da motilidade bacteriana. As bactérias tornaram-se rapidamente imóveis na presença de 50 µg/mL de própolis. Entre os seus componentes examinados isoladamente, o CAPE (ácido cafeico feniletil éster) foi o mais potente inibidor de motilidade, uma vez que na concentração de 20 µM promoveu a total inibição. Porém, seu efeito foi reversível, provavelmente por inativação ou detoxificação deste composto. A motilidade também foi perdida, embora não tão drasticamente, na presença de outros componentes da própolis. Uma ordem decrescente dos compostos em eficiência na inibição da motilidade bacteriana foi determinada como, CAPE, quercetina, naringerina e ácido cafeico (MIRZOEVA et al., 1997).

Como a motilidade e a quimiotaxia são importantes fatores de virulência por guiar a bactéria aos seus sítios de aderência e invasão no hospedeiro, a ação anti-motilidade dos componentes da própolis pode ter importante função na inibição da patogênese bacteriana e no desenvolvimento de infecções (MIRZOEVA et al., 1997).

Segundo TAKAISI-KIKUNI e SCHILCHER (1994), que realizaram estudos através da microscopia eletrônica, sobre *Streptococcus agalactiae*, o extrato etanólico de própolis (EEP) inibe o crescimento bacteriano por prevenir a divisão celular, levando à formação de estreptococos pseudo-multicelulares (policarióticos), desorganiza o citoplasma, caracterizado pela presença de espaços vazios ou estruturas fibrosas (“fibrous-like”) e, ainda, causa alteração na membrana citoplasmática e defeitos na estrutura da parede celular, levando a bacteriólise parcial. Os mesmos autores, através de técnicas de microcalorimetria, ainda constataram que o EEP inibe a síntese proteica.

Tais achados mostram a complexidade do mecanismo de ação da própolis sobre as células bacterianas.

3.2.4.2. Relatos de estudos da atividade antibacteriana da própolis sobre diferentes espécies

Estudos *in vitro* da eficácia antimicrobiana de extrato alcoólico de própolis, proveniente de apiários em Botucatu, S.P, mostraram 100% de inibição do crescimento de estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* e, respectivamente, 90% e 91% de inibição das estirpes de *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, testadas (LANGONI et al., 1994). Deve-se ressaltar que essas espécies bacterianas estão entre as mais importantes e prevalentes na etiologia da mastite bovina.

Também 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 gêneros. Os autores ainda verificaram ação *in vitro* da própolis sobre espécies bastante resistentes aos

antimicrobianos comuns, sugerindo então o prosseguimento de pesquisas que explorem o combate destas infecções *in vivo*.

Em um outro trabalho realizado no Brasil, GOULART (1995) testou a atividade antibacteriana de um extrato etanólico de própolis do estado da Bahia, frente a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais. Dentre as espécies bacterianas testadas, as mais sensíveis foram o *Corynebacterium pyogenes* e o *Staphylococcus aureus* enquanto que a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Proteus mirabilis* foram os mais resistentes. Resultados semelhantes foram verificados por VARGAS et al. (1994), que utilizaram própolis obtida em apiários da região de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul.

Com o objetivo de se estudar a atividade antimicrobiana *in vitro* de três produtos farmacêuticos à base de própolis (extrato de própolis, solução de própolis e própolis em spray), em três concentrações diferentes (10,0; 1,0 e 0,1%), sobre leveduras e bactérias (Gram positivas e negativas), HOFFMANN et al. (1998) verificaram que o extrato de própolis a 10% inibiu o crescimento de 100% das bactérias e de 44,4% das espécies de levedura. A solução de própolis mostrou-se ineficaz, nas três diferentes concentrações, em inibir os microorganismos testados.

Estudos sobre produtos comerciais à base de própolis brasileira mostraram que a concentração de resina especificada no rótulo é muito abaixo da que realmente foi encontrada (MENEZES et al., 1997). Os autores verificaram que a amostra que possuía a maior concentração de resina era, no entanto, a que demonstrou pior atividade bactericida aos microrganismos testados (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), o que evidencia que a origem da resina e por consequência, a sua composição química, é muito mais importante que a sua concentração em si.

Um componente ativo contra o *Bacillus subtilis* foi identificado como 3,5,7-tri-hidroxi-flavona (galangina). Outro flavonóide, a pinocembrina, também atua inibindo o crescimento do *Bacillus subtilis* (PEPELJNJAK et al., 1985). Além destes dois compostos citados, a pinobansina e o 3-acetato de pinobansina e a mistura de ácido cafeico com ácido benzil éster p-coumárico demonstraram

possuir efeito também sobre amostras de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (METZNER et al., 1979). Porém estas substâncias isoladas, quando analisadas comparativamente com os antibióticos, estreptomicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, nistatina, griseofulvina e sulfamerazina, não apresentaram efeito tão potente (METZNER et al., 1979). Sugere-se que a causa da ação bactericida sobre *Staphylococcus sp* seria o resultado de uma ação conjunta de vários componentes, uma vez que nenhum deles possui relativa atividade quando testado isoladamente (GRANGE e DAVEY, 1990).

Resultados parecidos também foram observados por BANKOVA et al. (1996) que, estudando a ação antibacteriana de ácidos diterpênicos de uma amostra de própolis brasileira, verificaram que nenhum componente isolado possuía atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* tão potente quanto a observada com todo o extrato.

Testes realizados com amostras referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC35218), quando submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) a 50% v/v, mostraram que concentrações de EEP aproximadamente iguais ou maiores que as respectivas concentrações mínima inibitórias (MIC) exercem efeito bactericida marcante à partir de 6 a 9 horas de exposição. Embora os perfis da curva do tempo de sobrevivência das duas bactérias estudadas tenham sido similares, a concentração do EEP para exercer efeito bactericida efetivo sobre a *E.coli* foi cerca de 10 vezes maior que o observado para o *S. aureus* (FERNANDES JÚNIOR et al., 1997).

Comportamento semelhante foi relatado em outro estudo em que foi pesquisada a atividade bacteriostática dos extratos alcoólicos (40%, v/v) de 15 amostras de própolis de diferentes origens e países. A amostra mais ativa sobre *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, mostrou uma concentração inibitória mínima em torno de 80µg/mL e, 67% das amostras de própolis inibiram ambos microrganismos à partir de 100µg/mL. No entanto, em relação a *E. coli*, 60% das amostras apresentaram valores de MIC entre 800 a 900 µg/mL. Os autores também relatam que o MIC observado para tetraciclina foi 53 vezes menor que

os valores de MIC nas amostras de própolis, em relação a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e cerca de 400 vezes menor contra *E. coli* (BONVEHI et al., 1994).

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

Estudos mostram que existe sinergismo entre extratos de própolis e alguns antibióticos de uso comum, conforme observado por KEDZIA e HOLDERNA (1986), em experimento onde amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, quando testadas frente a mistura de própolis e antibiótico mostraram, em 70% dos testes, MIC menor que o verificado com antibiótico sozinho. Neste caso, a mistura de própolis com oxitetraciclina, gentamicina ou bacitracina foi a mais efetiva.

Embora utilizando antibióticos diferentes, o sinergismo também foi observado por KROL et al. (1993), que estudaram 8 tipos de antibióticos, penicilina G, doxiciclina, estreptomicina, cloxacilina, cloranfenicol, cefradina, ampicilina e polimixina B. No entanto, o efeito descrito foi significativo apenas em concentrações de 600 µg/mL de extrato etanólico. E ainda, a ampicilina demonstrou antagonismo em relação ao extrato etanólico de própolis que, segundo os autores, pode ser 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.

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 450 µg/mL. Em concentrações menores que 200 µg/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 50 µg/mL e 100 µg/mL, quando comparado ao período Lag de células não tratadas. Sob concentrações maiores que 200 µg/mL, a inibição do crescimento foi irreversível. Parece que a própolis possui efeito bactericida maior que o bacteriostático, pois a adição de 100 µg/mL de própolis em suspensões de *B. subtilis* matou 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 e sobrevivência e conseqüente crescimento das células remanescentes. Os autores ainda sugerem que a retomada do crescimento bacteriano sob concentrações baixas de própolis pode também ser explicada por mecanismos como indução da detoxificação latente, inativação ou mecanismo de exclusão, seleção de formas resistentes ou detoxificação espontânea de componentes ativos da própolis (MIRZOEVA et al., 1997).

Pode ainda ser observado que a atividade antibacteriana da própolis sobre o crescimento bacteriano de *Bacillus subtilis* em meio sólido de ágar foi mais fraco que o observado em bactérias incubadas em meio líquido. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato do *Bacillus subtilis* ser um microrganismo aeróbio obrigatório e, a microaerofilia e a baixa taxa de crescimento proporcionada no centro da colônia no meio sólido de ágar tenha tornado a bactéria menos susceptível à própolis quando comparada com o crescimento em meio líquido (MIRZOEVA et al., 1997).

Não foi observada adaptação do *B. subtilis* à própolis, uma vez que o período Lag de crescimento bacteriano não foi encurtado por repetidas passagens na presença de concentrações relevantes de própolis, o que sugere a não ocorrência de seleção de formas resistentes (MIRZOEVA et al., 1997).

Concentrações de própolis que não inibiram o crescimento bacteriano em meio sólido de ágar, foram usadas para se estimar o sinergismo entre própolis e antibióticos. A adição de 100 µg/mL de própolis ao meio de ágar aumentou a sensibilidade do *Bacillus subtilis* à kanamicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, penicilina G e ampicilina. A própolis numa concentração de 50 µg/mL

apresentou pouco efeito. Numa concentração de 200 µg/mL, aumentou a sensibilidade da amostra selvagem de *E. coli* à tetraciclina e ácido nalidíxico. Porém, uma amostra de *E. coli* resistente à kanamicina, neomicina e ampicilina não adquiriu sensibilidade mesmo com a presença de 200 ou 400 µg/mL de própolis no meio. Os autores concluem que tais dados sugerem um pequeno efeito sinérgico entre própolis com alguns antibióticos (MIRZOEVA et al., 1997).

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%) e pinocembrina e cafeato de benzila (12%) o que levou os autores a pensarem que a atividade antimicrobiana da própolis não depende significativamente do sinergismo. Obviamente, o sinergismo observado depende fortemente da estrutura química das substâncias.

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, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e os extratos produzidos à partir da água, soluções tampão pH 5 e 6 não mostraram atividade sobre as amostras de *S. aureus*, *B. subtilis* e *Candida albicans* testadas. Estes últimos microrganismos 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 6 milímetros). Todos os extratos estavam numa concentração de 100 mg de própolis por 1 mL de solvente. Os extratos obtidos pelo uso de solventes orgânicos, e não aquosos, mostraram ainda a capacidade de inibir o crescimento de amostras, isoladas clinicamente, de *S. aureus* (halos de 13 mm de diâmetro), *S. epidemidis* e dez amostras de *Clostridium* spp. (halos de 12 a 13 mm de diâmetro). Os estreptococos dos

grupos A e C e o *Corynebacterium xerosis* não foram afetados. Os testes de inibição foram realizados em placas contendo meios de cultura IsoSensitest[®] ou ágar cérebro coração (BHI), não sendo encontrada nenhuma atividade antimicrobiana, sobre qualquer espécie, quando testado em meio de ágar sangue.

Após testarem vários extratos alcoólicos de própolis contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* β hemolítico, OBREGON e ROJAS (1990) verificaram que os resultados variavam com o método de extração porém, independente da concentração de álcool utilizada.

CHMIELEWSKA et al. (1991) estudaram e classificaram 129 amostras de própolis em três categorias diferentes quanto ao nível de atividade bactericida apresentado frente a uma amostra de *Bacillus subtilis*: A própolis foi considerada como de alta atividade, quando esta possuía a capacidade de matar todas as bactérias em meio de cultura numa concentração de 60-200 μ g/mL, média atividade em torno de 200-600 μ g/mL e de baixa atividade quando era requerido concentrações maiores que 600 μ g/mL. Observaram que a atividade média da própolis coletada de colônias originadas de abelhas rainhas de mesma raça diferenciaram através dos anos. Da mesma forma, num mesmo apiário, a própolis coletada numa mesma época do ano, mas de colônias diferentes, podem 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 observaram 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). Embora as amostras que possuíam alta atividade foram, em maior frequência, aquelas de colônias tidas como de alta produção, foi observado que própolis altamente ativa também pode, mesmo em menor frequência, ser encontrada em colônias que são pobres produtoras de própolis.

Amostras de própolis de regiões geográficas diferentes, dos trópicos (incluindo amostras brasileiras) e zona temperada, quando analisadas quanto à atividade antimicrobiana e composição química, mostraram peculiaridades no seu comportamento. Todas as amostras exibiram atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* e nenhuma ação sobre a amostra Gram negativa testada, *E. coli*. Porém o interessante foi notar atividades similares em extratos alcoólicos de própolis de composição química totalmente diferente. Amostras européias e da Mongólia, onde predominam ésteres de ácidos fenólicos e flavonóides agliconas mostraram comportamento similar a todas as amostras brasileiras, incluindo aquelas oriundas de abelhas selvagens, que contém pequenas quantidades ou não contém ésteres de ácidos fenólicos e somente traços de flavonóides agliconas. A grande quantidade de ácidos aromáticos (derivados do ácido coumárico) e ácidos diterpênicos pode ter contribuído para a atividade antibacteriana dessas amostras. Os resultados mostraram que a composição química e propriedades biológicas da própolis não permitem selecionar uma substância individualmente ou uma classe de substâncias como responsável pela ação. Obviamente, em amostras diferentes, diferentes combinações de substâncias são essenciais para a atividade biológica da própolis. É importante notar que todas as investigações sobre a ação antimicrobiana de substâncias individuais, isoladas de própolis, mostraram que nenhum componente isolado possui atividade maior que a do extrato total, o que leva a sugerir que a composição química da própolis possui valor farmacológico geral como uma mistura natural e não como uma fonte de novos compostos antimicrobianos poderosos (KUJUMGIEV et al., 1999).

GLINSKI e MERESTA (1993) estudaram a ação antimicrobiana de 592 amostras de própolis de várias regiões da Polônia e mostraram que seus extratos etanólicos diferiram nas suas atividades antimicrobianas. A concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos variou de 60 a 490 µg/ml e a concentração mínima bactericida (MBC), de 110 a 1680 µg/ml para *Staphylococcus aureus*. Assim os autores sugerem que a padronização da própolis deve ser baseada tanto nos valores de MIC quanto na MBC. Ainda sugerem que a própolis mais efetiva deve

ser caracterizada por valores de MIC abaixo de 300µg/ml e MBC não mais que 450 µg/ml e que, os métodos de extração e de determinação da atividade antibacteriana devem ser rigidamente definidos, pois afetam tanto a MIC quanto a MBC da própolis.

Embora muitos dos estudos aqui relatados mostram que a própolis possui pouca atividade inibitória, ou nenhuma, contra espécies bacterianas Gram negativas (BRUMFITT et al., 1990; GRANGE e DAVEY, 1990; BONVEHI et al., 1994; WOISKY et al., 1994; VARGAS et al., 1994; GOULART, 1995; PARK, et al., 1997; KUJUMGIEV et al., 1999), foi verificado por MIRZOEVA et al. (1997) que a própolis apresentou um potente efeito bactericida contra a espécie Gram negativa *Rhodobacter sphaeroides*, sugerindo então que a barreira proporcionada pela porção externa da membrana plasmática das bactérias Gram negativas à própolis é espécie-dependente. Possivelmente devido a variações na composição de porinas e lipopolissacarídeos da membrana externa.

Foi observada uma concentração mínima inibitória do EEP (25% v/v) sobre *Streptococcus agalactiae* entre 0.5 a 1.5 µg/mL, porém, houve diferença na sensibilidade bacteriana ao EEP entre as duas amostras de *Streptococcus agalactiae* estudadas. O extrato estudado continha 0,82% de ácido cafeico, 1,24% de p-ácido coumárico, 0,62% de ácido ferúlico, 0,4% de ácido isoferúlico, 0,84% de ácido benzóico e 0,35% de ácido 3,4-dimetoxicinâmico, alguns flavonóides (1,8%) como a crisina, a fisetina, a galangina e a quercetina, e açúcares (TAKAISI-KIKUNI e SCHILCHER, 1994).

MERESTA e MERESTA (1985a) testaram a atividade antimicrobiana de 9 flavonóides componentes de própolis obtida na Polônia. Foram testados contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. A concentração mínima inibitória (MIC) contra *S. aureus* foi menor para kaempferide, seguido de miricetina, quercetina, rhamnetina, kaempferol e robinetina. A MIC para morina, narigerina e herperetina foi mais de 3.5 vezes maior. A concentração mínima bactericida (MBC) contra *S. aureus* foi baixa para os componentes com baixa MIC, exceto para quercetina. Contra *B. subtilis*, valores de MIC foram similares, mas ligeiramente maiores que aqueles verificados contra *S. aureus*.

3.2.5. Própolis e mastite

Existem poucos trabalhos na literatura científica sobre o uso de extratos de própolis e/ou derivados no tratamento ou prevenção da mastite em bovinos ou em outra espécie doméstica. O primeiro relato na literatura sobre a utilização de um protocolo de tratamento de mastite através da própolis remonta de 1980, por MIROLYUBOV e BARSKOV (1980). Neste trabalho, foi pesquisada a eficiência na cura de diversos tipos de mastite, em bovinos, através de duas preparações à base de extrato etanólico da própolis, com concentrações diferentes. Nos animais que apresentavam a mastite serosa e catarral, aplicou-se, por via intramamária, 5 ml, 2 vezes ao dia, e 7 ml, “overnight”, de uma pomada com 2% de extrato etanólico da própolis. Para as mastites do tipo purulenta e hemorrágica, usou-se uma pomada a 5%, na mesma posologia descrita acima. Após o tratamento, efetuou-se o exame bacteriológico do leite/ou secreção onde pôde ser constatado uma brusca diminuição de bactérias em todos os tipos de mastite, exceto na purulenta. A produção de leite foi recuperada em 97% dos casos de mastite serosa, 96% da mastite catarral, 72% da purulenta, 83% da hemorrágica. Somente em dois animais, que apresentavam a mastite do tipo purulenta, houve endurecimento do tecido glandular infectado, resultando numa recuperação de apenas 50% da produção leiteira. Os autores concluíram que a utilização das pomadas a 2 e 5% de concentração, para o tratamento dos diversos tipos de mastite, resulta em ótimo efeito terapêutico, encurtando o processo de cura (MIROLYUBOV e BARSKOV, 1980).

No caso de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina, testes *in vitro* com amostras de extratos de própolis, originários da Polônia, mostraram uma concentração inibitória mínima em torno de 80µg/mL (MERESTA e MERESTA, 1985b).

MERESTA et al. (1989) testaram um tratamento de mastite bovina com extrato de própolis. A recuperação completa foi observada em 86,6% das vacas com mastite aguda, em 100% dos casos de infecção causados por *Candida albicans*, 85% por *Escherichia coli*, 91% por *Staphylococcus sp* e 84,3% por

Streptococcus sp. Os autores ainda concluíram que a própolis apresenta-se bastante efetiva na terapia da mastite causada por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais.

Outro produto à base de própolis foi estudado quanto à sua eficiência e inocuidade quando aplicado como infusão intramamária. Neste caso utilizou-se doses terapêuticas e até três vezes maiores. Mudanças na temperatura da pele do úbere, condutividade elétrica, contagem de células somáticas e dosagem das concentrações de cloreto foram comparadas em amostras de leite coletadas antes, durante e depois do 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 no leite aumentaram sem no entanto, exceder o limite fisiológico. O mais significativo aumento foi observado na contagem de células somáticas, que esteve acima do limite de 500.000 células/mL durante 6 (seis) dias após o tratamento. Quanto à eliminação, traços mensuráveis da droga não foram detectados em cromatografia de camada fina (limite de detecção: 30µg/litro) (ROMVARY et al., 1993).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária e no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia, com o apoio do Setor de Apicultura do Departamento de Biologia Animal.

4.2. Identificação de vacas com mastite

Foram utilizadas vacas de raça holandesa pura ou mestiça de holandesa com zebú, de propriedades localizadas na Zona da Mata de Minas Gerais e outra no Estado do Espírito Santo.

Para a identificação da mastite subclínica foi utilizado o “California Mastitis Test” (SCHALM e NOORLANDER, 1957), conforme DINIZ (1997), utilizando-se 2 mL de leite e 2 mL de reagente de CMT¹ (solução detergente aniônica, com indicador púrpura de bromocresol). A mastite clínica foi diagnosticada após exame clínico e verificação dos sinais característicos da doença.

¹ CMT FATEC

4.3. Colheita das amostras de leite

Após diagnosticada a mastite, em suas diversas formas de apresentação, as amostras de leite para isolamento e identificação do agente foram colhidas, imediatamente antes da ordenha, em frascos estéreis, com os devidos cuidados de higiene e assepsia. Previamente, os úberes e tetos foram lavados e desinfetados com produtos à base de cloro ou iodo e secados com toalha de papel descartável. Os dois primeiros jatos de leite foram colhidos na caneca de fundo escuro e o terceiro no frasco para exame bacteriológico (FARIA, 1995).

4.4. Isolamento e identificação das espécies bacterianas

As amostras de leite foram inicialmente pré-incubadas a 37° C, por 6 a 18 horas e, posteriormente, utilizando-se uma alça de platina, inoculadas em placas contendo ágar sangue base², adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas inoculadas foram incubadas a 37° C, por 24-48 horas (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1969).

As colônias com características macroscópicas próprias de estafilococos, estreptococos e coliformes eram transferidas para tubos contendo caldo cérebro coração de bezerro (BHI)³ e incubadas a 37° C, por 24 horas. Após a confirmação do crescimento nesse meio, foram preparados esfregaços em lâminas de vidro para o estudo da coloração e morfologia dos microorganismos isolados.

Para a identificação das espécies bacterianas, além das características morfotintoriais pelo método de Gram, utilizou-se o método recomendado pelo “NATIONAL MASTITIS COUNCIL” (1969). Também foram empregados testes específicos para identificação de cada espécie.

² Merck S.A. Rio de Janeiro – RJ

³ Difco Laboratories. Detroit – Michigan – USA

4.5. Identificação presuntiva dos microrganismos

4.5.1. *Staphylococcus aureus*

As culturas que apresentaram características microscópicas próprias de estafilococos foram submetidas às provas complementares visando sua identificação presuntiva.

A classificação presuntiva do *Staphylococcus aureus* se baseou nas seguintes, às quais apresentou resultados positivos: Hemólise em ágar sangue; Prova da catalase (HOLMBERG, 1973); Prova da coagulase (SCHALM et al, 1971); Reação da desoxirribonuclease (DNase) (KOWALSKI, 1977), em ágar DNase⁴; Fermentação do manitol, em ágar sal-manitol⁵; Crescimento anaeróbico em meio líquido de tioglicolato de Brewer (EVANS e KLOOS, 1972) ; Reação de Voges-Proskawer, conforme descrito em BIER (1985).

4.5.2. *Streptococcus agalactiae*

Os estreptococos foram identificados de acordo com a Prova da catalase, reação de CAMP e tipo de hemólise em ágar sangue de carneiro.

A prova de CAMP foi realizada de acordo com o método descrito em QUINN et al. (1994) onde, uma cultura de estafilococo, capaz de produzir hemólise β (beta), era estriada no centro de uma placa contendo ágar sangue de carneiro. A cultura de estreptococo a ser testada, retirada do BHI através de uma alça de platina, foi inoculada perpendicularmente a um ou dois milímetros da linha de inoculação do estafilococo. Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C, por 18-24 horas e então examinadas para hemólise e reação CAMP. A reação CAMP positiva é indicada por uma zona semicircular de lise completa, dentro da zona de hemólise β (beta) produzida pelo estafilococo.

⁴ Difco Laboratories. Detroit-Michigan-EUA

⁵ Biobrás. Montes Claros-MG

4.5.3. Coliformes

As colônias que apresentaram características microscópicas próprias de bastonetes Gram negativos, foram estriadas em placas com meio eosina-azul de metileno – EMB⁶. Considerou-se na identificação presuntiva, como positiva para coliformes, após incubação a 37° C por 24 horas, no meio EMB, a presença de colônias negras e a coloração verde-metálica do meio de cultura.

4.6. Obtenção da amostra de própolis

A amostra de própolis estudada foi produzida pelo sistema CPI[®] (Coletor de Própolis Inteligente), desenvolvido pelo apicultor Sr. Adomar Jesus de Carvalho. Foi colhida em colmeias de abelhas africanizadas, *Apis mellifera*, numa propriedade rural localizada no Município de Itapeçerica (MG), e cedida pelo referido apicultor. A própolis possuía cor verde e odor balsâmico agradável.

4.7. Processamento da própolis e avaliação da atividade antibacteriana dos extratos obtidos através de fracionamento em diferentes solventes

Antes de iniciar o processo de extração, os fragmentos da placa de própolis foram triturados, pesados e, posteriormente, secados, dentro de uma placa de Petri, em estufa a 50° C por 18 horas.

4.7.1. Obtenção dos extratos de própolis (extração seqüencial)

Com o objetivo de avaliar a possível atividade antibacteriana das diferentes frações da amostra de própolis, esta foi processada visando o seu fracionamento seqüencial utilizando-se os seguintes solventes extratores, segundo uma ordem decrescente de polaridade: água, etanol, metanol, acetato de etila e clorofórmio.

⁶ Biobrás. Montes Claros – M.G

Inicialmente, adicionou-se 100 mL de água destilada em um frasco contendo 10 g de própolis. A solução foi aquecida em forno de microondas por 90 segundos e a seguir colocada em banho-maria (45° C) por uma hora e, finalmente, filtrada em papel de filtro Whatman número 1. O filtrado obtido foi classificado como sendo Fração Aquosa (F-H₂O).

Ao resíduo retido no filtro foi adicionado 10mL de álcool etílico 95° G.L. e então a mistura foi levada ao agitador (200 rpm) a 45° C por 48 horas. Após nova filtragem em papel de filtro Whatman número 1, obteve-se a Fração Etanólica (F-EtOH). Este mesmo procedimento foi realizado para a obtenção das Frações Metanólica (F-MeOH), Acetato de Etila (F-EtAc) e Clorofórmio (F-Chl), adicionando-se ao resíduo, o mesmo volume (10mL) dos solventes metanol absoluto, acetato de etila e clorofórmio, respectivamente.

4.7.2. Técnica do antibiograma em discos de papel de filtro com sobrecamada de meio de cultura

Utilizou-se discos de papel filtro (Whatman número 1), com 7 mm (milímetros) de diâmetro, impregnados com alíquotas de 40µL e 60µL, de cada fração extraída da própolis (F-H₂O, F-EtOH, F-MeOH, F-EtAc e F-Chl). Em seguida, os discos foram secados em capela de fluxo laminar, para a evaporação do solvente e, logo após, fixados à superfície do meio sólido de ágar-água⁷ a 2%. Paralelamente, preparou-se, em tubos, 10 mL do meio semi-sólido a 0,75% de BHI, adicionados com 1 mL da cultura bacteriana a ser testada previamente crescida por 18 horas a 37° C em BHI. O conteúdo destes tubos foi vertido sobre as placas para a obtenção de uma fina sobre-camada de meio. As placas então, foram incubadas por 18 a 24 horas em estufa a 37° C. Durante a leitura, considerou-se como limiar de inibição, a presença de halo em volta do disco onde não havia crescimento bacteriano visível. Também foram preparados discos de papel com alíquotas de 40 e 60 µL de etanol⁷ e de metanol⁷ puros para verificar se exerciam efeito inibidor, mesmo após o período de secagem, capazes

⁷ Merck S.A. Rio de Janeiro – RJ

de alterar os resultados finais do teste. Também foi utilizado, para efeito de comparação, um extrato etanólico de própolis, de origem desconhecida, adquirido no comércio, nas mesmas alíquotas adotadas para os outros extratos.

Para esta análise foram avaliadas quatro amostras diferentes de *Staphylococcus aureus*, quatro amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, quatro amostras de *Streptococcus agalactiae* e três amostras de Coliformes, obtidas conforme itens 4.3, 4.4 e 4.5. Os testes foram realizados em triplicata.

4.8. Determinação da curva de sobrevivência bacteriana frente aos extratos etanólicos de própolis

Realizou-se o estudo da atividade antibacteriana do extrato etanólico da própolis, por ter este apresentado efeito antibacteriano mais evidente na técnica do antibiograma. Três concentrações diferentes de álcool etílico (70, 80 e 95%) foram empregadas no processo de extração da própolis.

4.8.1. Preparo dos extratos etanólicos

Na preparação dos extratos, utilizou-se a mesma própolis e, antes da extração, procedeu-se conforme o item 4.7, adicionando-se os respectivos solventes extratores (álcoois), na concentração de 3g de própolis pura para cada 10 mL de solvente. Logo a seguir, as soluções foram acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados, para evitar a evaporação dos solventes, colocadas em estufa a 45°C, sob agitação, por 48 horas e finalmente filtradas em papel de filtro Whatman número 1. Classificou-se os filtrados como sendo, extrato etanólico 70% (EEP 70), extrato etanólico 80% (EEP 80) e extrato etanólico 95% (EEP 95). Para que fosse efetuada a medição da quantidade de resina obtida no processo de extração, as soluções foram levadas à estufa a 40°C até que a evaporação completa dos solventes fosse observada. As soluções estoque, então numa concentração de 300mg de resina por 1,0 mL do respectivo

solvente (etanol 70, 80 e 95%), foram acondicionadas em geladeira, sob temperatura de 4°C, ao abrigo da luz.

4.8.2. Diluição dos extratos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP-95) em tubos contendo caldo BHI

Utilizou-se concentrações diferentes de extrato etanólico de própolis para cada uma das espécies bacterianas estudadas. Tais concentrações foram encontradas a partir de resultados obtidos em pré-ensaios.

Assim, procedeu-se à diluição dos diferentes extratos de própolis em tubos contendo um volume final de 5 mL de caldo cérebro-coração (BHI). Os respectivos extratos de própolis foram adicionados ao meio nas quantidades pré-determinadas para cada espécie estudada, conforme Tabela 4.

Testes preliminares mostraram que as amostras de *E.coli* apresentaram-se resistentes aos três extratos etanólicos em concentrações de até 60mg/mL. Acima desta concentração, os solventes dos três tipos de extratos, os álcoois 70, 80 e 95% começavam a exercer efeito bactericida não sendo, portanto, possível avaliar a influência destas concentrações de extrato etanólico da própolis sobre as bactérias.

Tabela 4 - Diluição das soluções estoque (300mg/mL) de extrato etanólico de própolis (EEPs) em tubos contendo caldo BHI

Espécie	Volume EEP (mL)	BHI (mL)	Vol. Final (mL)	Diluição	Concentração EEP no meio
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0500	4,9500	5,0	1:100	3,0 mg/mL
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,0334	4,9666	5,0	1:150	2,0 mg/mL
	0,0071	4,9929	5,0	1:700	0,43 mg/mL
	0,0050	4,9950	5,0	1:1000	0,3 mg/mL

4.8.3. Determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), em meio de “Plate Count Agar (PCA)”⁸

À partir de colônias isoladas e individualizadas em placas de ágar sangue, e utilizando-se de uma alça de platina, procedeu-se a inoculação de 2 a 3 colônias em um tubo contendo volume final de 5 mL de BHI. Após a incubação, a 37° C, por 12-18 horas, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL que foram inoculadas nos tubos de caldo BHI contendo os diferentes tipos de extratos (EEP-70, EEP-80 e EEP-95%), nas respectivas concentrações, conforme tabela 4. Também foram realizadas inoculações de 0,1 mL de suspensão bacteriana em tubo BHI sem extrato de própolis, constituindo-se no controle positivo.

A determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foi obtida em placas contendo meio próprio para a contagem de colônias, o “Plate Count Agar” (PCA). Para tanto, procedeu-se da seguinte maneira (Figura 1): à partir dos tubos recém inoculados, retirava-se alíquotas de 0,1 mL e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, estas eram espalhadas sobre a superfície do meio.

Com a finalidade de se estudar o efeito das diferentes concentrações dos extratos etanólicos da própolis e do tempo de exposição das bactérias a esses extratos, a inoculação das alíquotas em meio PCA foi feita após 0, 6, 12 e 24 horas de incubação a 37°C, das bactérias nos tubos BHI/própolis e BHI/puro. Após a incubação das placas por 24h/37°C, finalmente contava-se aquelas que continham até 300 colônias.

Nesta etapa testou-se os três diferentes extratos etanólicos da própolis frente a três diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* e dois de *Streptococcus agalactiae*, obtidos conforme itens 4.3, 4.4 e 4.5. Os testes foram realizados em triplicata.

⁸ Difco Laboratories. Detroit-Michigan-EUA

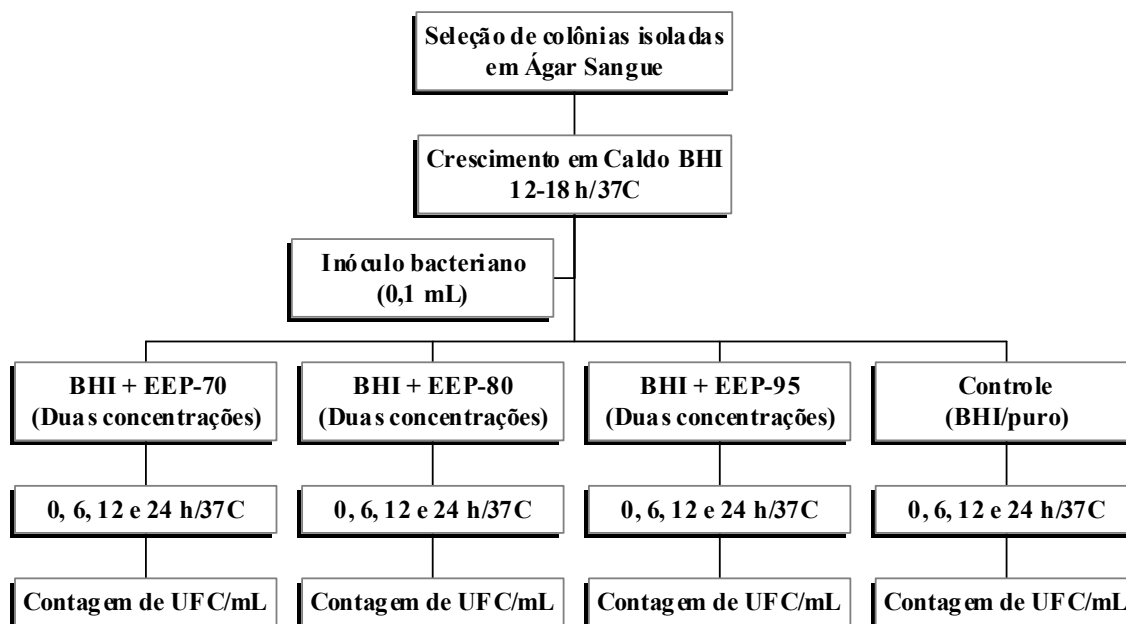


Figura 1 - Resumo esquemático do procedimento de avaliação da curva de sobrevivência das bactérias estudadas nos ensaios de extratos etanólicos de própolis x tempo de incubação, avaliadas através de contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) em placa com meio “plate count agar (PCA)”

4.9. Análise estatística

Para a avaliação do efeito inibidor das diferentes frações da própolis (F-H₂O, F-EtOH, F-MeOH, F-EtAc, F-Chl) sobre as bactérias isoladas do leite de vacas com mastite subclínica ou clínica, foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla Tukey, considerando o experimento como do tipo Fatorial no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC).

No estudo quantitativo da susceptibilidade bacteriana das amostras de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* aos três diferentes extratos etanólicos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP 95), no decorrer dos quatro tempos de incubação das culturas (0, 6, 12 e 24 horas), o experimento foi analisado como do tipo Parcelas Subdivididas (“Split Plot”), no DIC, sendo

considerado como a subparcela, os quatro momentos de contagem de UFC/mL. Os dados para análise foram transformados segundo a fórmula: $Y = \text{Log } X + 1$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software SAEG/UFV, versão 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise da atividade antibacteriana dos diferentes extratos (frações) de própolis

Os halos de inibição das culturas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase (-), *Streptococcus agalactiae* e coliformes pelos diferentes extratos de própolis, na concentração de 10%, em dois volumes, 40 e 60µL, por disco, são apresentados nos Apêndices A, tabelas 1A, 2A, 3A e 4A, respectivamente.

Os resultados mostraram que os extratos etanólico comercial, etanólico e, em menor proporção, o metanólico inibiram o crescimento das amostras Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase (-) e *Streptococcus agalactiae*. A espécie Gram negativa avaliada não apresentou sensibilidade a nenhum dos extratos, não evidenciando halo de inibição. Este comportamento, de certa forma, era esperado, uma vez que muitos relatos ilustram que a própolis detém maior poder antibacteriano sobre as espécies Gram positivas, sendo pouco eficaz ou incapaz de inibir o crescimento de bactérias Gram negativas (BRUMFITT et al., 1990; FUENTES e HERNANDEZ, 1990; GRANGE e DAVEY, 1990; WOISKY et al., 1994; VARGAS et al., 1994; GOULART, 1995; PARK, et al., 1997; KUJUMGIEV et al., 1999). Esta diferença de sensibilidade entre bactérias Gram positivas e Gram negativas pode

ser devido a diferenças na constituição química da parede celular destes dois grupos de bactérias. Enquanto que na parede celular dos gêneros Gram negativos a quantidade de peptidoglicanos se encontra numa fração menor quando comparado ao que ocorre nas bactérias Gram positivas, o conteúdo lipídico e a complexidade química da parede celular das bactérias Gram negativas são consideravelmente maiores que nas Gram positivas. Talvez seja por estas diferenças que os componentes fenólicos da própolis, os maiores responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano, segundo os relatos na literatura, não consigam interagir com a parede celular das bactérias Gram negativas da mesma maneira que interagem nas espécies Gram positivas. Mas no entanto, outros autores observaram alguma atividade antibacteriana de extratos de própolis sobre bactérias Gram negativas, mesmo que para isso, a dose de própolis requerida tenha sido muitas vezes maior que para amostras Gram positivas (OBREGON e ROJAS, 1990; BONHEVI et al., 1994; LANGONI et al., 1994; FERNANDES JÚNIOR et al., 1997; MIRZOEVA et al., 1997).

Esta variação dos resultados sobre a atividade antibacteriana da própolis pode ser explicada por muitos fatores, que podem influenciar decisivamente no resultado dos testes. Além das origens diferentes das amostras de própolis estudadas, e por consequência, as suas composições químicas, fatores como, as diferentes estirpes de bactérias de uma mesma espécie, a concentração e metodologia adotada no processo de extração da própolis e, finalmente, o método de avaliação da inibição do crescimento bacteriano (condições de temperatura, tipos de meios de cultura, tempo de incubação, técnicas diferentes de análise) podem alterar completamente o resultado de um experimento em relação ao encontrado por outro pesquisador.

O extrato aquoso não exerceu nenhum efeito inibidor do crescimento das amostras bacterianas testadas, estando de acordo com os dados de BRUMFITT et al. (1990), PARK et al. (1998) e PARK e IKEGAKI (1998). Tal dado mostra mais uma vez que os componentes ativos com capacidade antibacteriana na própolis (fenólicos, flavonóides, ácidos e outros) não são solubilizados pela água, um solvente de alta polaridade, conforme também verificado por WOISKY e

SALATINO (1998), MARCUCCI et al. (1999a), NEGRI et al. (1999a) e DANTAS et al. (2000).

PARK et al. (1998) e PARK e IKEGAKI (1998) também observaram que o extrato aquoso de própolis não exibiu atividade antibacteriana sobre espécies Gram positivas e ainda, à medida que o solvente utilizado possuía uma porcentagem de água superior a 50%, menor era a atividade antibacteriana do respectivo extrato.

Os extratos acetato de etila e clorofórmio não apresentaram nenhum efeito inibitório, no entanto isto pode estar relacionado à maneira como foi realizado o processo de extração, ou seja, seqüencial. Assim, possivelmente possa ter ocorrido uma completa, ou quase completa, extração dos compostos biologicamente ativos pelos solventes que os antecederam, o etanol e metanol, onde a própolis possui ótima solubilidade.

A seguir é realizada uma análise, por espécie, do comportamento dos extratos testados.

5.1.1. *Staphylococcus aureus*

Os resultados dos testes de inibição do crescimento das quatro diferentes amostras de *Staphylococcus aureus* pelos diferentes extratos da própolis estudada, extrato comercial e controle dos veículos etanol e metanol são apresentados na tabela 5.

Para esta espécie, somente os extratos etanólico (F-EtOH), metanólico (F-MeOH) e etanólico comercial demonstraram inibir o crescimento bacteriano. Os extratos aquoso (F-H₂O), acetato de etila (F-EtAc) e clorofórmio (F-Chl) não possuíram atividade inibidora. Também constatou-se que os veículos, etanol puro e metanol puro, em quantidades até maiores que as presentes nos extratos, não exerceram influência no crescimento bacteriano.

Tabela 5 - Diâmetros médios, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento de quatro amostras de *Staphylococcus aureus*, determinados pelos extratos de própolis, na concentração de 10%

EXTRATO	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Amostra UFV	Amostra Viçosa I	Amostra Viçosa II	Amostra Viçosa IV
Ext. Comercial	14,3 a ^{AI}	11,33 a ^B	9,16 a ^C	9,83 a ^C
F-EtOH	11,16 b ^A	9,83 b ^B	8,66 a ^C	9,00 a ^C
F-MeOH	9,33 c ^A	8,16 c ^B	4,00 b ^C	4,16 b ^C
F-H ₂ O	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
F-EtAc	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
F-Chl	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
Controle EtOH	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
Controle MeOH	0,00d ^A	0,00d ^A	0,00c ^A	0,00c ^A

^{AI} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

O extrato etanólico comercial produziu halos de inibição com diâmetros maiores que os encontrados no extrato etanólico teste (F-EtOH) ($p < 0,05$), em duas amostras, UFV e Viçosa I, embora não tenha existido esta diferença ($p > 0,05$) nos tamanhos dos halos nas amostras Viçosa II e Viçosa IV. A amostra UFV mostrou ser a mais sensível aos extratos etanólico comercial, etanólico e metanólico, seguida da amostra Viçosa I.

As amostras Viçosa II e Viçosa IV não diferiram entre si na sensibilidade aos três extratos e também foram as que apresentaram menor sensibilidade. Tais achados ilustram diferenças entre amostras bacterianas de mesma espécie, mas de origens diferentes.

O fato do extrato metanólico (F-MeOH) ter apresentado menor capacidade em inibir as quatro amostras bacterianas, se comparado ao F-EtOH, pode ter duas possíveis explicações. O etanol, que foi aplicado à própolis antes

do metanol, poderia ter extraído a maior parte dos compostos bioativos, restando somente uma pequena quantidade dos mesmos ou apenas traços, para que o metanol pudesse extrair, o que também demonstraria que o protocolo de extração adotado não permitiu que o etanol extraísse a totalidade dos compostos, ou que as substâncias que estavam presentes na F-MeOH realmente fossem solúveis apenas em metanol e por conseguinte, não foram extraídas pelo etanol. Isto demonstra a necessidade de aumentar as pesquisas na área de métodos de extração da própolis.

Os diâmetros médios dos halos de inibição do crescimento do *S. aureus* ao extrato etanólico variou entre 8,66 e 11,16 mm. Essas dimensões não foram muito diferentes das encontradas por outros autores. BRUMFITT et al. (1990), em experimento semelhante, encontraram halos de inibição de *S. aureus* com diâmetros que variaram entre 7 e 14 mm (média = 13 mm), em discos de papel de filtro (diâmetro = 6 mm) impregnados com extrato etanólico de própolis na mesma concentração utilizada neste trabalho, 1g/10mL. Esta mesma concentração foi utilizada por BANKOVA et al. (1995) que, trabalhando com quatro amostras de própolis brasileira, mas utilizando extrato produzido por etanol a 70%, encontraram halos de inibição cujos diâmetros variaram entre 6 e 10 mm. KUJUMGIEV et al. (1999), estudando estas mesmas quatro amostras brasileiras, também na concentração de 1g/10mL, observaram halos variando entre 10 e 13 mm de diâmetro. DOBROWOLSKI et al. (1991) encontraram diâmetro médio de 16 mm usando uma concentração de 300mg/mL de extrato etanólico de própolis da Polônia. BANKOVA et al. (1996), estudando extrato metanólico (1g/10mL) de uma amostra de própolis brasileira, encontraram halos de inibição que tiveram o diâmetro médio de $11,8 \pm 0,8$ mm. Deve-se ressaltar ainda que fatores como a metodologia adotada no processo de extração da própolis e o método adotado para a avaliação da inibição do crescimento bacteriano podem alterar completamente o resultado de um experimento em relação ao encontrado por outro pesquisador.

5.1.2. *Staphylococcus* sp. coagulase negativos

Os resultados dos testes de inibição do crescimento das quatro diferentes amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativos pelos diferentes extratos da própolis estudada, extrato comercial e controle dos veículos etanol e metanol são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Diâmetros médios, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento de quatro amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, determinados pelos extratos de própolis, na concentração de 10%

EXTRATO	<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativos			
	Amostra Fundão I	Amostra Fundão II	Amostra UFV	Amostra P. Firme
Ext. Comercial	9,33 a ^{AI}	9,33 a ^A	9,66 a ^A	10,16 a ^A
F-EtOH	9,16 a ^{AB}	8,33 ab ^B	10,0 a ^A	8,83 a ^{AB}
F-MeOH	7,0* b ^A	6,66* b ^A	0,00 b ^B	0,00 b ^B
F-H ₂ O	0,00 c ^A	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
F-EtAc	0,00 c ^A	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
F-Chl	0,00 c ^A	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
Controle EtOH	0,00 c ^A	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
Controle MeOH	0,00 c ^A	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A

^{I/} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

* Houve repetição em que o diâmetro do halo foi zero.

Também para este gênero, assim como para o *S. aureus*, somente os extratos etanólico (F-EtOH), metanólico (F-MeOH) e etanólico comercial demonstraram inibir o crescimento bacteriano. Os extratos aquoso (F-H₂O), acetato de etila (F-EtAc) e clorofórmio (F-Chl) não possuíram atividade

inibidora. Também constatou-se que os veículos, etanol puro e metanol puro, em quantidades até maiores que as presentes nos extratos, não exerceram influência no crescimento bacteriano.

Diferentemente do observado entre algumas das amostras de *Staphylococcus aureus*, o extrato comercial, produziu halos de inibição com diâmetros que não diferiram ($p > 0,05$) dos encontrados na F-EtOH, em todas as quatro amostras de *Staphylococcus* sp. Coagulase negativas estudadas, mesmo estas sendo de origens diferentes.

Todas as quatro amostras mostraram perfis de sensibilidade à F-EtOH semelhantes, com diâmetros médios dos halos de inibição variando entre 10 (Amostra UFV) e 8,33 mm (Amostra Fundão II). A semelhança de sensibilidade à própolis entre as quatro amostras também pôde ser comprovada através do extrato etanólico comercial, onde as quatro médias dos halos de inibição não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Com relação à F-MeOH, esta mostrou-se mais uma vez menos eficiente em inibir as amostras bacterianas em relação aos extratos etanólicos, assim como foi observado para o *Staphylococcus aureus*. As amostras *Staphylococcus* sp. UFV e *Staphylococcus* sp. P.Firme não mostraram sensibilidade a F-MeOH, ao passo que as amostras provenientes do mesmo local, *Staphylococcus* sp. Fundão I e *Staphylococcus* sp. Fundão II, foram pouco sensíveis.

5.1.3. *Streptococcus agalactiae*

Os resultados dos testes de inibição do crescimento das quatro diferentes amostras de *Streptococcus agalactiae* aos diferentes extratos da própolis estudada, extrato comercial e controle dos veículos etanol e metanol são apresentados na tabela 7.

Também para esta espécie, assim como para o *S. aureus* e o *Staphylococcus* sp. Coagulase negativo somente os extratos etanólico (F-EtOH), metanólico (F-MeOH) e etanólico comercial demonstraram atividade antibacteriana. Os extratos aquoso (F-H₂O), acetato de etila (F-EtAc) e

clorofórmio (F-Chl) não possuíram atividade inibidora. Também constatou-se que os veículos, etanol puro e metanol puro, em quantidades até maiores que as presentes nos extratos, não exerceram influência no crescimento bacteriano.

Tabela 7 - Diâmetros médios, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento de quatro amostras de *Streptococcus agalactiae*, determinados pelos extratos de própolis, na concentração de 10%

EXTRATO	<i>Streptococcus agalactiae</i>			
	Amostra UFV II	Amostra P. Firme I	Amostra P. Firme II	Amostra P. Firme III
Ext. Comercial	13,33 a ^{B1}	15,50 a ^A	13,33 a ^B	14,66 a ^A
F-EtOH	12,16 a ^B	14,33 a ^A	12,50 a ^B	13,83 a ^A
F-MeOH	8,16 b ^B	0,00 b ^C	11,00 b ^A	8,00 b ^B
F-H ₂ O	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
F-EtAc	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
F-Chl	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
Controle EtOH	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
Controle MeOH	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A

^{1/} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Neste caso foi verificado que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano pelo extrato etanólico comercial e pela F-EtOH dentro de cada amostra de *Streptococcus agalactiae*, assim como foi observado para as amostras de *Staphylococcus sp.* Coagulase negativos.

As amostras *S. agalactiae* P. Firme I e P. Firme III, cuja sensibilidade ao extrato comercial e à F-EtOH foram iguais entre si ($p > 0,05$), foram as que apresentaram maiores sensibilidades a estes dois extratos, ao passo que as

amostras UFV II e P. Firme II, também de sensibilidades iguais entre si ($p>0,05$), demonstraram menores susceptibilidades aos respectivos extratos.

Os diâmetros médios dos halos de inibição, em todos os três extratos que mostraram atividade antibacteriana, foram claramente maiores que os encontrados nas duas outras espécies bacterianas anteriormente estudadas. Para o extrato etanólico comercial variou de 13,33 a 15,5 mm e nas F-EtOH e F-MeOH, de 12,16 a 14,33 mm e 8,16 a 11,0 mm de diâmetro (com exceção da amostra P.Firme I, que foi zero), respectivamente. O que demonstra que o *Streptococcus agalactiae* é aparentemente mais sensível à própolis em relação às outras espécies aqui estudadas. Isto de certa forma era esperado, pois é sabido que o *S. agalactiae* se apresenta muito mais sensível aos agentes antimicrobianos de uso comum (antibióticos e quimioterápicos) se comparado ao *S. aureus* e outros agentes bacterianos causadores de mastite bovina.

5.2. Análise da curva de sobrevivência bacteriana frente aos extratos etanólicos de própolis

Os resultados obtidos a partir da média de três repetições das análises da eficácia antibacteriana (curva de sobrevivência) dos três extratos etanólicos de própolis, EEP-70, EEP-80 e EEP-95, através dos quatro tempos de incubação (0, 6, 12 e 24 horas), em duas concentrações por amostra bacteriana, das bactérias *S. aureus* amostra Viçosa I, *S. aureus* amostra Teixeira II, *S. aureus* amostra Teixeira III, *S. agalactiae* amostra UFV II e *S. agalactiae* amostra ES-ST I são apresentados nos Apêndices B, C, D, E e F, respectivamente. As análises de variância (ANOVA) desses resultados são apresentadas nas tabelas, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Foi verificado que os solventes não exerciam efeito inibidor ou bactericida sobre as culturas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, incubadas a 37°C/24hora, quando aplicados nos tubos de BHI nas mesmas quantidades utilizadas para os extratos.

Tabela 8 - Análise de variância do ensaio da curva de sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, amostra Viçosa I aos extratos etanólicos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP-95), em duas concentrações, de acordo com o tempo de incubação (0, 6, 12 e 24 horas)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Extratos (EEPs 70, 80 e 95)	2	0,9235897	0,4617949	0,55 ^{ns}
Concentração (2 e 3 mg/mL)	2	1080,136	540,0682	644,8**
Extr. x Conc.	4	0,6947706	0,1736926	0,21 ^{ns}
Resíduo A	18	202,3380	11,24100	
Tempo (0, 6, 12 e 24 horas)	3	34,39814	11,46605	13,69**
Tempo x Extr.	6	0,7277576	0,1212929	0,14 ^{ns}
Tempo x Conc	6	96,02201	16,00367	19,11**
T x E x C	12	0,9244592	0,7703827	0,09 ^{ns}
Resíduo B	54	45,22249	0,8374535	
TOTAL	107	1461,388		

** significativo em nível de $p < 0,01$

^{ns} Não-significativo

Coefficiente de variação = 13,514

Tabela 9 - Análise de variância do ensaio da curva de sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeiras II, aos extratos etanólicos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP-95), em duas concentrações, de acordo com o tempo de incubação (0, 6, 12 e 24 horas)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Extratos (EEPs 70, 80 e 95)	2	2,035670	1,017835	1,0 ^{ns}
Concentração (2 e 3 mg/mL)	2	957,6411	478,8206	472,5**
Extr. x Conc.	4	1,442093	0,3605233	0,36 ^{ns}
Resíduo A	18	87,04322	4,835734	
Tempo (0, 6, 12 e 24 horas)	3	29,07421	9,691401	9,56**
Tempo x Extr.	6	22,04405	3,674008	3,63 ^{ns}
Tempo x Conc	6	89,80453	14,96742	14,77**
T x E x C	12	15,51008	1,292507	1,28 ^{ns}
Resíduo B	54	54,71389	1,013220	
TOTAL	107	1259,309		

** significativo em nível de $p < 0,01$

^{ns} Não-significativo

Coefficiente de variação = 15,221

Tabela 10- Análise de variância do ensaio da curva de sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira III, aos extratos etanólicos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP-95), em duas concentrações, de acordo com o tempo de incubação (0, 6, 12 e 24 horas)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Extratos (EEPs 70, 80 e 95)	2	1,883201	0,9416007	2,39 ^{ns}
Concentração (2 e 3 mg/mL)	2	1388,578	694,2891	1765,3**
Extr. x Conc.	4	1,440204	0,3600509	0,92 ^{ns}
Resíduo A	18	12,58773	0,6993186	
Tempo (0, 6, 12 e 24 horas)	3	183,1217	61,04055	155,20**
Tempo x Extr.	6	3,853471	0,6422451	1,63 ^{ns}
Tempo x Conc	6	212,3916	35,39860	90,01**
T x E x C	12	2,680877	0,2234064	0,57 ^{ns}
Resíduo B	54	21,23781	0,3932928	
TOTAL	107	1827,775		

** significativo em nível de $p < 0,01$

^{ns} Não-significativo

Coefficiente de variação = 12,277

Tabela 11- Análise de variância do ensaio da curva de sobrevivência do *Streptococcus agalactiae*, amostra UFV II, aos extratos etanólicos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP-95), em duas concentrações, de acordo com o tempo de incubação (0, 6, 12 e 24 horas)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Extratos (EEPs 70, 80 e 95)	2	1,300035	0,6500173	0,68 ^{ns}
Concentração (0,3 e 0,43mg/mL)	2	949,1598	474,5799	500,0**
Extr. x Conc.	4	4,178102	1,044526	1,10 ^{ns}
Resíduo A	18	14,45481	0,8030453	
Tempo (0, 6, 12 e 24 horas)	3	249,2272	8307574	87,53**
Tempo x Extr.	6	5,321592	0,8869320	0,93 ^{ns}
Temp x Conc	6	331,4827	55,24712	58,21**
T x E x C	12	8,281601	0,6901334	0,73 ^{ns}
Resíduo B	54	51,25328	0,9491348	
TOTAL	107	1614,659		

** significativo em nível de $p < 0,01$

^{ns} Não-significativo

Coefficiente de variação = 16,836

Tabela 12- Análise de variância do ensaio da curva de sobrevivência do *Streptococcus agalactiae*, amostra ES-ST I, aos extratos etanólicos de própolis (EEP-70, EEP-80 e EEP-95), em duas concentrações, de acordo com o tempo de incubação (0, 6, 12 e 24 horas)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Extratos (EEPs 70, 80 e 95)	2	3,908474	1,954237	2,55 ^{ns}
Concentração (0,3 e 0,43mg/mL)	2	1026,871	513,4355	669,7**
Extr. x Conc.	4	2,487081	0,6217702	0,81 ^{ns}
Resíduo A	18	34,66065	1,925592	
Tempo (0, 6, 12 e 24 horas)	3	88,30637	29,43546	38,40**
Tempo x Extr.	6	3,081866	0,5136444	0,67 ^{ns}
Temp x Conc	6	85,45218	14,24203	18,58**
T x E x C	12	3,438399	0,2865333	0,37 ^{ns}
Resíduo B	54	41,39682	0,766078	
TOTAL	107	1289,603		

** significativo em nível de $p < 0,01$

^{ns} Não-significativo

Coefficiente de variação = 20,074

Segundo a análise de variância, em todas as amostras bacterianas estudadas, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,01$) na atividade antibacteriana dos extratos de própolis extraídos por diferentes concentrações de álcool etílico hidratado, 70, 80 e 95%, demonstrando que os três extratos tiveram comportamentos semelhantes da atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias. Este dado, de certo modo, discorda de autores que relatam diferenças entre extratos etanólicos de própolis produzidos à partir de álcoois diferenciados. Segundo MARCUCCI et al. (1999a), há maior ou menor eficiência de extração das substâncias fenólicas, nas quais concentra-se a maior parte da atividade farmacológica da própolis, dependendo do tipo de solvente empregado na extração ou mesmo das condições utilizadas no processo.

PARK et al. (1998) observaram que a maioria dos flavonóides identificados (quercetina, acacetina, kanferide, isoramnectina, pinocembrina) foram extraídos nas porcentagens etanólicas entre 60 e 80%, por consequência, a maior porcentagem de inibição do crescimento microbiano foi proporcionado pelos extratos etanólicos de própolis por álcool 60, 70 e 80%, havendo um

decréscimo nesta atividade nas porcentagens mais altas de etanol (90 e 95%).

Acreditava-se que o uso de diferentes álcoois pudesse produzir extratos etanólicos com algumas diferenças na composição química, e portanto, com atividades antimicrobianas um pouco diferenciadas. Como não houve esta distinção de atividade biológica entre os três extratos, possivelmente os componentes responsáveis por tal propriedade estavam presentes nas três soluções. Como relatado por WOISKY e SALATINO (1998), que verificaram, com o uso de álcool hidratado a 70% na extração da própolis, extratos com maior conteúdo de substâncias fenólicas que no caso de extração por álcool absoluto, embora não tenha sido notado diferença na produção de flavonóides entre os dois tipos de solventes. OBREGON e ROJAS (1990) verificaram que os resultados das análises de susceptibilidade bacteriana a diferentes extratos alcoólicos de própolis variavam com o método de extração aplicado porém, independente da concentração de álcool utilizada.

Ainda, pode-se constatar também diferenças significativas ($p < 0,01$), entre os números de UFC/mL, em todas as cinco amostras bacterianas, quando analisados os fatores, concentração do extrato etanólico da própolis, tempo de incubação das amostras e a interação entre estes dois fatores. Por esta interação ter sido significativa ($p < 0,01$), estudou-se então o desdobramento da influência de um fator dentro do outro e, através de um teste de comparações múltiplas de médias, encontrou-se as médias que diferiram entre si. Os resultados desta análise, considerando os quatro tempos de incubação (0, 6, 12 e 24 horas), e duas concentrações do extrato etanólico, por amostra bacteriana, das bactérias *S. aureus* amostra Viçosa I, *S. aureus* amostra Teixeira II, *S. aureus* amostra Teixeira III, *S. agalactiae* amostra UFV II e *S. agalactiae* amostra ES-ST I são apresentados nas tabelas 9, 10, 11, 12 e 13, respectivamente. Como não houve diferença entre os extratos, as médias estudadas nesta análise foram obtidas à partir do conjunto dos três extratos, EEP-70, EEP-80 e EEP-95.

Tabela 13 - Número (Log_{10}) de colônias viáveis por mililitro (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus*, amostra Viçosa I, ao longo do período de incubação com diferentes concentrações de extratos etanólicos de própolis

Concentração de própolis	Tempo de incubação a 37° C			
	0h	6h	12h	24h
Controle +	9,04 a ^{BI}	9,79 a ^B	10,91 a ^A	11,14 a ^A
3,0 mg/mL	5,48 b ^A	2,70 b ^B	2,46 b ^B	2,08 c ^B
2,0 mg/mL	5,69 b ^A	3,53 b ^B	3,25 b ^B	3,14 b ^B

^{I/} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 14 - Número (Log_{10}) de colônias viáveis por mililitro (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeiras II, ao longo do período de incubação com diferentes concentrações de extratos etanólicos de própolis

Concentração de própolis	Tempo de incubação a 37° C			
	0h	6h	12h	24h
Controle +	8,69 a ^{CI}	9,77 a ^B	10,13 a ^{AB}	10,69 a ^A
3,0 mg/mL	5,29 b ^A	2,91 b ^B	2,68 b ^B	2,73 b ^B
2,0 mg/mL	5,46 b ^A	3,70 b ^B	3,33 b ^B	1,93 b ^C

^{I/} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 15 - Número (Log_{10}) de colônias viáveis por mililitro (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeiras III, ao longo do período de incubação com diferentes concentrações de extratos etanólicos de própolis

Concentração de própolis	Tempo de incubação a 37° C			
	0h	6h	12h	24h
Controle +	8,05 a ^{CI}	9,14 a ^B	9,52 a ^{AB}	10,00 a ^A
3,0 mg/mL	5,52 b ^A	0,81 b ^B	0,00 b ^C	0,00 b ^C
2,0 mg/mL	5,47 b ^A	0,77 b ^B	0,00 b ^C	0,00 b ^C

^{I/} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 16 - Número (Log_{10}) de colônias viáveis por mililitro (UFC/mL) de *Streptococcus agalactiae*, amostra UFV II, ao longo do período de incubação com diferentes concentrações de extratos etanólicos de própolis

Concentração de própolis	Tempo de incubação a 37° C			
	0h	6h	12h	24h
Controle +	7,39 a ^{BI}	9,16 a ^A	9,80 a ^A	9,46 a ^A
0,43 mg/mL	6,77 a ^A	2,35 c ^B	0,17 b ^C	0,00 b ^C
0,3 mg/mL	6,57 a ^A	5,03 b ^B	0,69 b ^C	0,00 b ^C

^{IV} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 17 - Número (Log_{10}) de colônias viáveis por mililitro (UFC/mL) de *Streptococcus agalactiae*, amostra ES-ST I, ao longo do período de incubação com diferentes concentrações de extratos etanólicos de própolis

Concentração de própolis	Tempo de incubação a 37° C			
	0h	6h	12h	24h
Controle +	7,16 a ^{BI}	7,71 a ^{AB}	7,81 a ^{AB}	8,20 a ^A
0,43 mg/mL	3,93 b ^A	0,76 b ^B	0,00 b ^B	0,00 b ^B
0,3 mg/mL	3,59 b ^A	0,93 b ^B	0,22 b ^{BC}	0,00 b ^C

^{IV} Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

As figuras 2, 3, 4, 5 e 6 ilustram os perfis das curvas de sobrevivência das bactérias *S. aureus* amostra Viçosa I, *S. aureus* amostra Teixeira II, *S. aureus* amostra Teixeira III, *S. agalactiae* amostra UFV II e *S. agalactiae* amostra ES-ST I, respectivamente, a duas concentrações de EEP por amostra bacteriana.

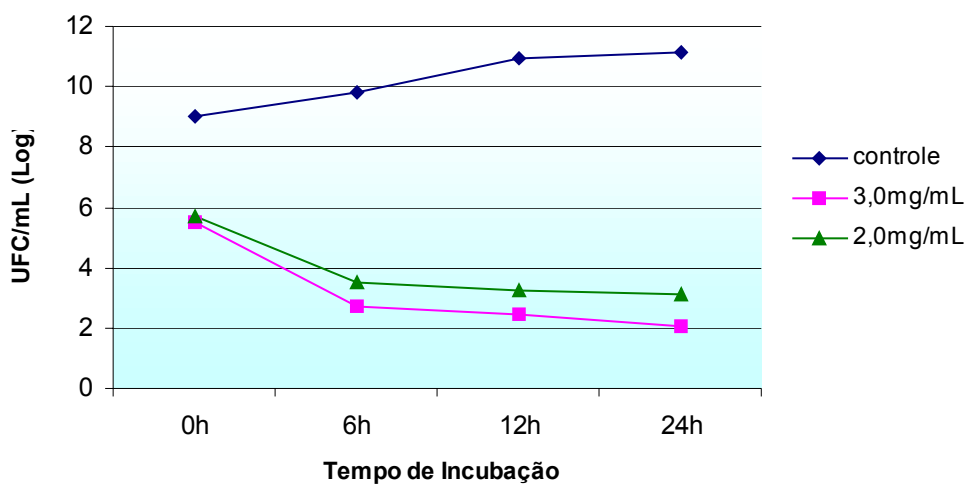


Figura 2 – Perfil da curva de sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, amostra Viçosa I, aos extratos etanólicos de própolis.

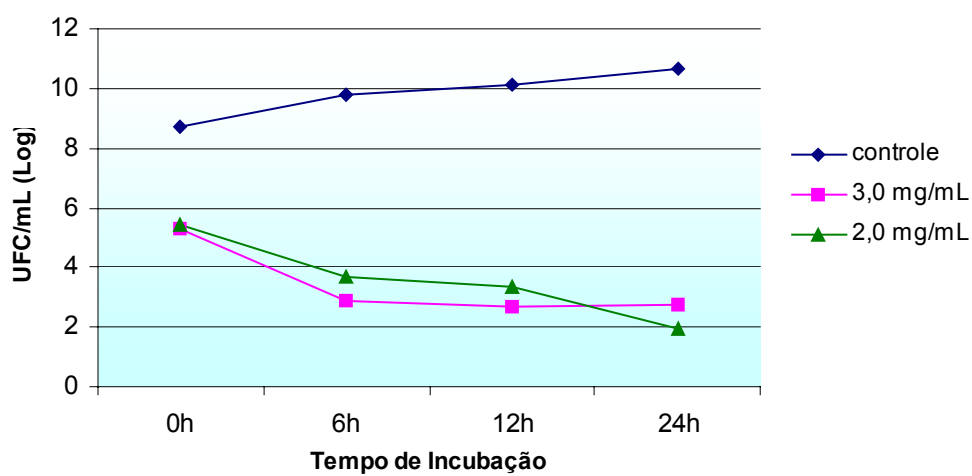


Figura 3 – Perfil da curva de sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira II, aos extratos etanólicos de própolis.

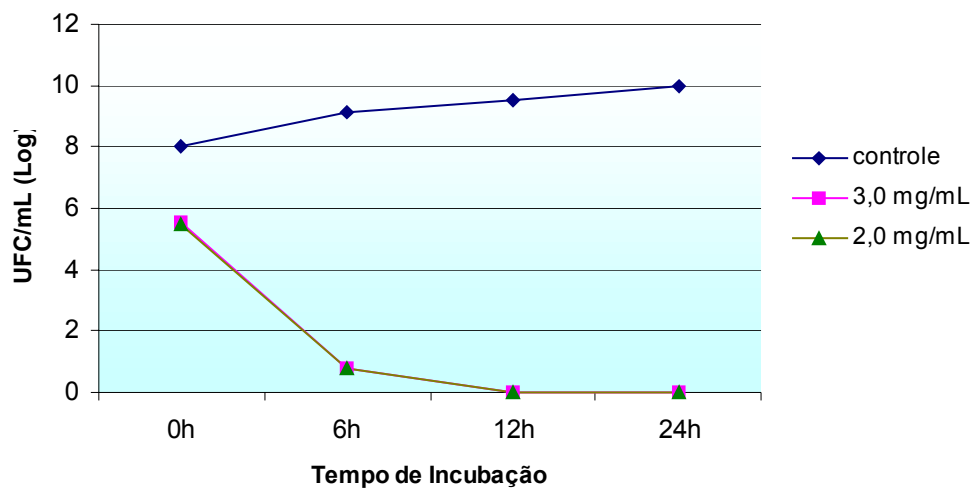


Figura 4 – Perfil da curva de sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira III, aos extratos etanólicos de própolis.

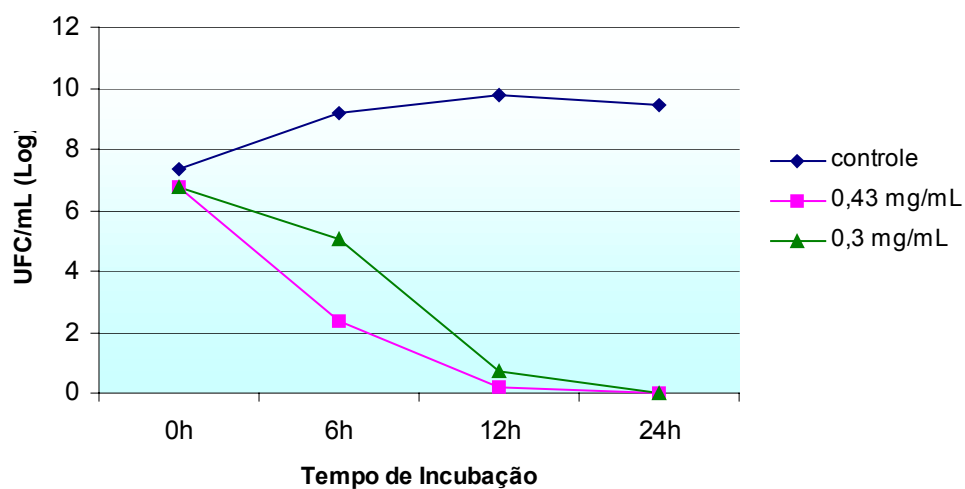


Figura 5 – Perfil da curva de sobrevivência do *Streptococcus agalactiae*, amostra UFV II, aos extratos etanólicos de própolis.

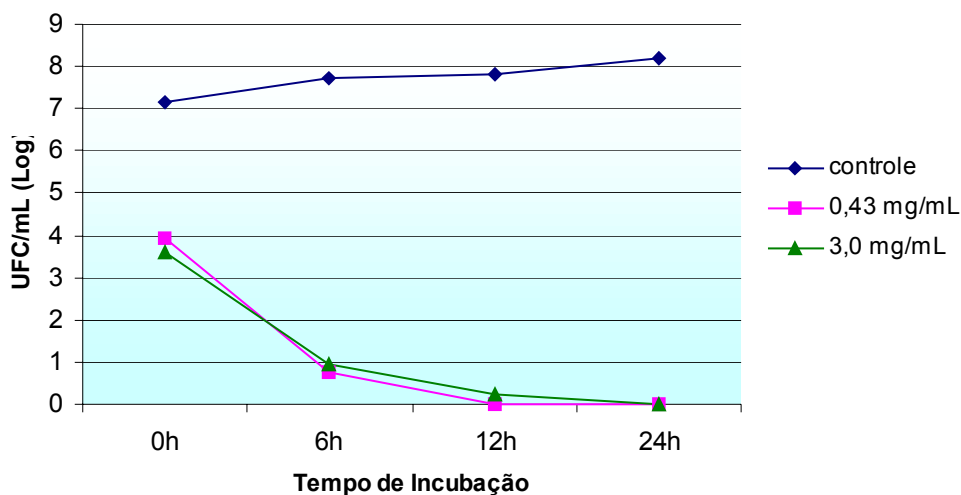


Figura 6 – Perfil da curva de sobrevivência do *Streptococcus agalactiae*, amostra ES-ST I, aos extratos etanólicos de própolis.

5.2.1. *Staphylococcus aureus*

Através dos resultados, observa-se que nas três amostras de *Staphylococcus aureus* estudadas, houve uma inibição do crescimento bacteriano já à partir do tempo zero (0h). Enquanto que, no tubo controle persistia o crescimento bacteriano, nos tubos com as duas concentrações de própolis, a inibição foi clara e acentuada durante todo o período de avaliação. Isto pode demonstrar um efeito bactericida da própolis pois, logo num primeiro contato com as células bacterianas, foi visível que a mesma proporcionou uma queda do número de unidades formadoras de colônia.

Conforme relatado por diversos autores, o *S. aureus* é sensível a muitos compostos presentes nos mais diversos tipos de extratos de própolis, de diferentes origens. Assim, pode-se explicar a acentuada sensibilidade deste importante agente infeccioso à própolis pesquisada no presente trabalho.

As duas concentrações utilizadas na avaliação da sensibilidade do *S. aureus*, 3,0 mg/mL e 2,0 mg/mL, inibiram, de maneira semelhante, as três amostras bacterianas testadas. Somente na amostra Viçosa I, houve diferença

entre as duas concentrações ao final das 24 horas de incubação, a dose de 3,0 mg/mL diminuiu mais o número de UFC/mL que a dose de 2,0 mg/mL ($p < 0,05$).

Durante todo o período de avaliação, não foi observado nenhum indício de reversão do crescimento bacteriano, em qualquer amostra, perante a própolis. Na amostra *S. aureus* Teixeira III, constatou-se uma ação bactericida da própolis, em ambas as dosagens, à partir de 12 horas de incubação. Não foi verificada ação bactericida dos extratos de própolis nas amostras Viçosa I e Teixeira II, em nenhuma das concentrações utilizadas, durante o período de 24 horas do estudo. Tal fato indica que há variação na sensibilidade de amostras de *S. aureus*, de origens diferentes, à própolis, como comumente acontece com outros tipos de antimicrobianos.

Segundo GRANGE e DAVEY (1990), BANKOVA et al. (1996) e KUJUMGIEV et al. (1999) a ação bactericida da própolis sobre *Staphylococcus sp.*, e sobre a grande maioria dos microrganismos sensíveis, seria o resultado de uma ação conjunta de vários componentes, pois, nenhum composto isolado possui atividade maior que a do extrato total. Isto sugere que a composição química da própolis possui valor farmacológico geral como uma mistura natural, e não como uma fonte de novos compostos antimicrobianos poderosos.

De acordo com FERNANDES JÚNIOR et al. (1997), o *S. aureus* sofreu efeito bactericida marcante à partir de 6 a 9 horas de exposição ao extrato etanólico de própolis, resultado semelhante ao do presente trabalho, onde foi verificada uma redução significativa à partir de 6 horas.

Embora tenha sido observado efeito inibidor e bactericida, para uma amostra bacteriana, dos extratos de própolis aos isolados de *S. aureus*, a dosagem requerida para tanto, neste experimento, foi muito acima das encontradas pela maioria dos autores. Enquanto que neste estudo, utilizou-se dosagens de 2 e 3 mg/mL para se obter efeito inibidor e bactericida (esta última no caso da amostra *S. aureus* Teixeira III), GLINSKI e MERESTA (1993) e BONVEHI et al. (1994) encontram valores que variaram de 60 a 1680 µg/mL e de 80 a 100 µg/mL, respectivamente. No caso de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina, MERESTA e MERESTA (1985b), encontraram uma

concentração inibitória mínima em torno de 80µg/mL. Estas diferenças possivelmente estão relacionadas às composições químicas diferentes da amostra de própolis e à sensibilidade dos isolados de *S. aureus* estudados. Os autores citados utilizaram própolis de origem européia. É necessário esclarecer ainda, que processos de extração diferenciados podem influenciar decisivamente na composição química de um extrato e assim, nas suas atividades biológicas.

5.2.2. *Streptococcus agalactiae*

Através dos resultados, observa-se que nas duas amostras de *Streptococcus agalactiae* estudadas, assim como nas amostras de *S. aureus*, houve uma inibição do crescimento bacteriano já à partir do tempo zero (0h), embora esta redução não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no tempo zero, para o *S. agalactiae* amostra UFV II. Enquanto no tubo controle havia ainda o crescimento bacteriano, nos tubos com as duas concentrações de própolis, a inibição foi clara e acentuada durante todo o período de avaliação.

Nas duas amostras bacterianas, houve efeito bactericida da própolis ao final do período de 24 horas de exposição. Com seis horas (6h) de incubação, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no número de UFC/mL entre as duas concentrações adotadas (0,43 e 0,3 mg/mL), na amostra *S. agalactiae* UFV II, a concentração de 0,43 mg/mL, até então, inibiu mais o crescimento bacteriano se comparado à concentração de 0,3 mg/mL. Mas ao final de 24 horas, as duas concentrações conseguiram destruir todas as células bacterianas existentes no meio de cultura.

Na amostra *S. agalactiae* ES-ST I, o comportamento das duas concentrações foi semelhante, não havendo diferença entre elas em nenhum momento da análise. Ambas produziram efeito bactericida ao final das 24 horas de incubação.

Assim como observado nas amostras de *S. aureus*, estes resultados mostram que também há variação na sensibilidade à própolis de amostras de *S.*

agalactiae de origens diferentes, como comumente acontece com outros tipos de antimicrobianos.

Pode-se observar que, com dosagens cerca de dez vezes menores que as aplicadas para *S. aureus*, houve uma completa e irreversível inibição do *S. agalactiae*, dentro do período estudado, demonstrando mais uma vez que este agente infeccioso se mostra muito sensível à própolis.

Segundo TAKAISI-KIKUNI e SCHILCHER (1994), o extrato etanólico de própolis inibe o crescimento de *Streptococcus agalactiae* por ter a capacidade de prevenir a divisão celular, levando à formação de estreptococos pseudo-multicelulares (policarióticos), inibir a síntese proteica, desorganizar o citoplasma, caracterizado pela presença de espaços vazios ou estruturas fibrosas (“fibrous-like”) e, ainda, causar alteração na membrana citoplasmática e defeitos na estrutura da parede celular, levando à bacteriólise parcial. Possivelmente, estes mecanismos de injúria à célula bacteriana foram os responsáveis pela ação bactericida verificada no presente estudo. Assim como encontrado neste estudo, também verificaram diferenças na sensibilidade bacteriana ao EEP entre as duas amostras de *Streptococcus agalactiae* que estudaram. Os autores encontraram uma concentração mínima inibitória do EEP (25% v/v) sobre o *Streptococcus agalactiae*, entre 0,5 a 1,5 µg/mL, muito menor do que a estudada neste experimento (0,43 e 0,3 mg/mL). Mais uma vez, tal diferença pode ser explicada por fatores que podem alterar decisivamente o resultado de um experimento em relação ao outro, como: origens diferentes das amostras de própolis estudadas, e por consequência, as suas composições químicas, fatores como, as diferentes estirpes de bactérias de uma mesma espécie, a concentração e metodologia adotada no processo de extração da própolis e, finalmente, o método de avaliação da inibição do crescimento bacteriano (condições de temperatura, tipos de meios de cultura, tempo de incubação, técnicas diferentes de análise).

5.3. Considerações finais

Os resultados obtidos mostram a capacidade de extratos etanólicos de própolis em inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*, três dos mais importantes agentes causadores da mastite bovina, sendo o primeiro muito conhecido por ser de difícil combate. Estes resultados estimulam o prosseguimento de novas pesquisas sobre a utilização de extratos de própolis, em veículos adequados, visando o tratamento da mastite bovina.

Por ter sido eficaz na inibição de agentes comuns na mastite contagiosa, pode ser sugerido, no futuro, com base em novas pesquisas, protocolos de tratamento para a cura de mastites adquiridas durante a lactação. Ou ainda, abre-se perspectivas para a utilização da própolis em combinação com antimicrobianos, visando reduzir a dose terapêutica de determinados antibióticos e assim, diminuir custos, incidência de efeitos colaterais, a presença de resíduos no leite de consumo (aspecto de saúde pública) e, ao mesmo tempo, potencializar a antibioticoterapia no tratamento de infecções, onde a resistência bacteriana torna-se fator determinante. Alguns estudos mostram o sinergismo entre extratos de própolis e alguns antibióticos de uso comum. Por também ser um agente antiinflamatório e cicatrizante, sua utilização em processos infecciosos tais como a mastite, possivelmente encurtaria o tempo de recuperação de animais acometidos com mastites agudas e severas, potencializando o efeito antibiótico da própolis.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados e nas condições em que foi conduzido o presente experimento, pode-se concluir que:

- A amostra de própolis estudada exerce efeito antibacteriano, através dos extratos etanólico e, em menor proporção, do metanólico, sobre o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, e *Streptococcus agalactiae*, mas não mostra capacidade em inibir o crescimento da amostra Gram negativa, nas concentrações utilizadas.
- Os extratos aquoso, acetato de etila e clorofórmio não apresentaram efeito antibacteriano, na extração seqüencial.
- Amostras diferentes, de uma mesma espécie bacteriana, diferem quanto à sensibilidade à própolis.
- Não se obteve diferenças na atividade antibacteriana de extratos etanólicos produzidos através dos álcoois 70, 80 e 95%.
- As concentrações de 2,0 e 3,0 mg/mL de extratos etanólicos de própolis inibem acentuadamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*.
- As concentrações de 0,3 e 0,43 mg/mL de extratos etanólicos de própolis são bactericidas para *Streptococcus agalactiae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOROS, M., SAUVAGER, F., GIRRE, L., CORMIER, M. *In vitro* antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v.23, p.231-240, 1992.

AMOROS, M., SIMÕES, C.M.O., GIRRE, L., SAUVAGER, F., CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus Type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, n.12, p.1732-1740, 1992.

Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíficas Européias - APACAME. Regulamentos técnicos para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Mensagem Doce**, n.52, p.13-14, 1999.

BANKOVA, V., CHRISTOV, R., KUJUMGIEV, A., MARCUCCI, M.C., POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.50, n.3-4, p.167-172, 1995.

BANKOVA, V., CHRISTOV, R., STOEV, G., POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 607, p.150-153, 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, n.4, p.361-367, 1998.

- BANKOVA, V., MARCUCCI, M.C., SIMOVA, S., NIKOLOVA, N., KUJUMGIEV, A., POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.51, n.5-6, p.277-280, 1996.
- BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L. High-peformance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journal of Chromatography**, v.242, p.135-143, 1982.
- BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., PRASAIN, J.K., MATSUSHIGE, K., SAIKI, I., KADOTA, S. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n.7, p.896-900, 1998.
- BIER, O. Técnicas bacteriológicas. In: BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. Cap.50, p.919-998.
- BONVEHI, J.S., COLL, F.V., 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. In: WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA, 1, 1996, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 1996. p. i e ii.
- BRUMFITT, W., HAMILTON-MILLER, J.M.T., FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products:1. Propolis. **Microbios**, v.62, n.250, p.19-22, 1990.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.
- CASTRO, S.L., HIGASHI, K.O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanossoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.46, n.1, p.55-58, 1995.

- CHENG, P.C., WONG, G. Honey bee propolis: prospects in medicine. **Bee World**, v.77, n.1, p.8-15, 1996.
- CHMIELEWSKA, H.R., MUSZYNSKA, J., KONOPACKA, Z. Antibacterial activity of propolis as affected by the conditions of its collection. **Pszczelnicze Zeszyty Naukowe**, 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: 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.16-18.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNADI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.422-434.
- DAMIAN, G., KURTEN, C., MARCUCCI, M.C., PAULINO, N., SCREMIN, A. Avaliação da propriedade cicatrizante da própolis em modelo de lesão cirúrgica em camundongos. **Revista da Universidade de Franca**, v.7, n.7, p.58-59, 1999. Edição especial.
- DANTAS, T.N.C., NETO, A.A.D., SILVA, H.S.R.C. Desenvolvimento de sistemas microemulsionados utilizando a própolis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas, M.G. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: 2000. v.2, PN-055.
- DeGRAVES, F.J., FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. **The Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v.9, n.3, p.421-434, 1993.
- DIMOV, V., IVANOVSKA, N., MANOLOVA, N., BANKOVA, N., NIKOLOV, V., POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v. 22, n.2, p. 155-162, 1991.
- 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.

DOBROWOLSKI, J.W., VOHORA, S.B., SHARMA, K., SHAH, S.A., NAQVI, S.A.H., DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, n.1, p.77-82, 1991.

DONADIEU, Y. **La Propolis**. Paris: Maloine, 1980. p.14-15.

EVANS, J.B., KLOOS, W.E. Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. **Applied Microbiology**, v.23, n.2, p.326-331, 1972.

FARIA, J.E. **Prevenção e controle de infecção estafilocócica da glândula mamária pela vacinação e/ou antibioticoterapia associada ao dimetilsulfóxido (DMSO)**. Belo Horizonte: UFMG, 1995. 101 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.

FERNANDES JÚNIOR, A., LOPES, C.A.M., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.3, n.2, 1997.

FUENTES, A.M.O., HERNANDEZ, N.R. Accion antimicrobiana de los extractos alcoholicos de propoleo. **Revista Cubana de Farmacia**, v.24, n.1, p.34-44, 1990.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.

GIRAUDO, J.A., CALZOLARI, A., RAMPONE, H., RAMPONE, A., GIRAUDO, A.T., BOGNI, C., LARRIESTRA, A., NAGEL, R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. Evaluation in heifers. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.5, p.845-853, 1997.

- GLINSKI, Z., MERESTA, T. Trials to standardize the antibacterial activity of propolis. **Medycyna Weterynaryjna**, v.49. n.1, p. 27-29, 1993.
- 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.
- GRANGE, J.M., DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, n.3, p. 159-160, 1990.
- HEINZE, W., HOLZ, J., NATTERMANN, H., BLANKENSTEIN, P. Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance. **Tierarztl Umschau**, v.53, n.6, p.321-326, 1998.
- HIGASHI, K.O., CASTRO, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.43, n.8, p. 149-155, 1994.
- HILLERTON, J.E. Controle da Mastite Bovina. In: WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA, 1, 1996, Juiz de Fora, M.G. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 1996. p.6-25.
- HOFFMANN, F.L., GARCIA-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.
- HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavia.**, p.1-144, 1973. (Supplement, 45)
- 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.

- IVANOVSKA, N.D., DIMOV, V.B., PAVLOVA, S., BANKOVA, V.S., POPOV, S.S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **Journal of Ethnopharmacology**, v.47, p. 135-143, 1995.
- 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.
- KLOOS, W.E., SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus*. In: SNEATH, P.H.A. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams, e Wilkins, 1986. v.2, p.1013-1055.
- KOO, M.H., PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, n.2, 367-369, 1997.
- KOWALSKI, J.J. Microbial agents and bovine mastitis. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.170, n.10, p.1175-1177, 1977.
- KROL, W., CZUBA, Z., SCHELLER, S., GABRYS, J., GRABIEC, S., SHANI, J. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. **Biochemistry International**, v.21, n.4, p. 593-597, 1990.
- KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., PIETSZ, 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 of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.

- LANGONI, H., DOMINGUES, P.F., FUNARI, S.R.C., CHANDE, C.G., NEVES, I.R., LISTONI, F.J.P. Efeito antimicrobiano *in vitro* da propolis. In: CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4, 1994, Rio Cuarto, Argentina, **Anais...** Rio Cuarto, Argentina: Editora, 1994. p. 189-192.
- MAKASHVILI, Z.A. De la historia de la utilizacion del 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. 7-8.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, n.2, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M.C., NEGRI, G., CUNHA, I.B.S. Substâncias fenólicas em diferentes extratos de própolis, avaliadas por CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22, 1999, Poços de Caldas, M.G. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: Editora, 1999a. v.3, TC-031.
- MARCUCCI, M.C., NEGRI, G., OLIVEIRA JUNIOR, M. Isolamento e identificação de uma substância fenólica em própolis brasileira, por CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22, 1999, Poços de Caldas, M.G. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: Editora, 1999b. v.2, PN-139.
- MARCUCCI, M.C., NEGRI, G., PAULINO, N. Avaliação química e farmacológica da própolis do Sul do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22, 1999, Poços de Caldas, M.G. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: Editora, 1999c. v.1, MD-066.
- MATSUNO, T., CHEN, C., BASNET, P. A tumouricidal and antioxidant compound isolated from an aqueous extract of propolis. **Medical Science Research**, v.25, p. 583-584, 1997.
- MATSUSHIGE, K., BASNET, P., HASE, K., KADOTA, S., TANAKA, K., NAMBA, T. Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**, v.3, n.2, p. 203-209, 1996.

- 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. Edição especial.
- MENEZES, H., BACCI JUNIOR, M., OLIVEIRA, S.D., PAGNOCCA, F.C. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, v.28, n.2, p.71-76, 1997.
- MERESTA, L., MERESTA, T. Antibacterial activity of flavonoid compounds of propolis, occurring 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 an extract of propolis. **Medycyna Weterynaryjna**, v.45, n.7, p 392-395, 1989.
- METZNER, J., BEKEMEIER, M., PAINTZ, M., SCHNEIDEWIND, E. On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. **Pharmazie**, v.34, n.2, p.97-102, 1979.
- 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.
- MIYATAKA, H., NISHIKI, M., MATSUMOTO, H., FUJIMOTO, T., MATSUKA, M., ISOBE, A., SATOH, T. Evaluation of propolis. II. Effects of brazilian and chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and concanavalin A. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n.7, p.723-729, 1998.

- MIYATAKA, H., NISHIKI, M., MATSUMOTO, H., FUJIMOTO, T., MATSUKA, M., SATOH, T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of brazilian and chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n.5, p.496-501, 1997.
- MORONI, F.T., HAMAGUCHI, A., BRANDEBURGO, M.A.M. Avaliação da eficácia de diferentes doses de própolis na redução da parasitemia e no aumento da sobrevivência em camundongos experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Universidade de Franca**, v.7, n.7, p.50, 1999. n.7, Edição especial.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4th ed. Madison.: 1998. 64p.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis**. Washington D.C.: University of New Hampshire Press, 1969. 27p.
- NEGRI, G., MARCUCCI, M.C., OLIVEIRA JUNIOR, M. Estudo de ceras de própolis brasileiras através da utilização da CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22, 1999, Poços de Caldas, M.G. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: Editora, 1999a. v.3, QA-123.
- NEGRI, G., VIEIRA, M. J., MARCUCCI, M. C., OLIVEIRA JUNIOR, M. Avaliação do conteúdo fenólico de bebidas à base de própolis por cromatografia líquida de alta eficiência. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22, 1999, Poços de Caldas, M.G. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: Editora, 1999b. v.3, TC-030.
- 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 extracts of propolis. **Revista Cubana de Farmacia**, v.24, n.1, p.34-44, 1990.

- OKUYAMA, C.E., RAICHASKI, L.B., MARCUCCI, M.C., NEGRI, G., PAULINO, N. Avaliação da constituição química e da atividade analgésica de amostras de própolis de Santa Catarina, de São Paulo e do Ceará. **Revista da Universidade de Franca**, v.7, n.7, p.51-52, 1999. Edição especial.
- PARK, Y.K., IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.11, p.2230-2232, 1998.
- PARK, Y.K., IKEGAKI, M., ABREU, J.A.S., ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998.
- PARK, Y.K., KOO, M.H., IKEGAKI, M., CONTADO, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.40, n.1, p.97-106, 1997.
- PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I., MAYSINGER, D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. **Pharmazie**, v.40, n.2, p.122-123, 1985.
- PHILPOT, W.N., NICKERSON, S.C. **Mastitis: counter attack**. Naperville, Illinois: Babson Bros., 1997. 150p.
- 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**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. 631p.
- RAICHASKI, L.B., OKUYAMA, C.E., PAULINO, N. Avaliação do efeito antinociceptivo de compostos identificados na própolis no modelo das contorções abdominais em camundongos. **Revista da Universidade de Franca**, v.7, n.7, p.56, 1999. Edição especial.
- ROMVARY, A., SZITA, G., CSIKO, G., GASPAS, Z., GASPAS, I. Effectiveness of an intramammary infusion with no antibiotics. IV. Innocuity

test of new intramammary infusion. **Magyar Allatorvosok Lapja**, v.48. n. 8, p. 493-497, 1993.

SAID, R.A. **Atividade hepatoprotetora do extrato aquoso da própolis, nos quadros de insuficiência hepática fulminante induzidos por acetaminofen, em camundongos.** Viçosa, M.G.: UFV, 1998. 47p. Monografia (Especialização em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

SCHALM, O.W., CARROL, E.J., JAIN, N.C. **Bovine mastitis.** Philadelphia: Lea e Febirger, 1971. 360p.

SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.130, n.5, p.199-204, 1957.

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.

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.

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

TATEFUJI, T., IZUMI, N., OHTA, T., ARAI, S., IKEDA, M, KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.7, p.966-970, 1996.

- TAZAWA, S., WARASHINA, T., NORO, T., MIYASE, T. Studies on the constituents of brazilian propolis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.46, n.9, p.1477-1479, 1998.
- VALDES, G., ROJAS, N.M., MORALES, C. Ensayo preliminar de la accion antifungica de extractos de propoleo sobre *Candida albicans*. **Ciencia y Tecnica en la Agricultura -apicultura**, v.3, p. 41-49, 1987.
- 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.
- VESTWEBER, J.G., LEIPOLD, H.W., *Staphylococcus aureus* mastitis. Part I. Virulence, defense mechanisms, and establishment of infection. **Food Animal Practice**, v.15, p.1561-1566, 1993.
- 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.
- WOISKY, R.G., GIESBRETCH, A.M, SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.30, n.1, p. 19-21, 1994.
- WOISKY, R.G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, n.2, p.99-105, 1998.
- YAMAUCHI, R., KATO, K., OIDA, S., KANAEDA, J., UENO, Y. Benzyl Caffete, an antioxidant compound isolated from propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.8, p.1321-1322, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 1A - Diâmetro médio e desvio-padrão dos halos de inibição, em milímetros, do crescimento de amostras de *Staphylococcus aureus* determinados pelos diferentes extratos de própolis (1g/10mL)

Extratos	Vol. μL	<i>S. aureus</i> UFV					<i>S. aureus</i> Viçosa I					<i>S. aureus</i> Viçosa II					<i>S. aureus</i> Viçosa IV				
		A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP
Extrato Aquoso	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Etanólico	40	11,0	11,0	11,0	11,0	±0,0	11,0	9,0	9,0	9,6	±1,2	8,0	9,0	9,0	8,6	±0,6	9,0	9,0	8,0	8,6	±0,6
	60	12,0	11,0	11,0	11,3	±0,6	11,0	10,0	9,0	10,0	±1,0	8,0	9,0	9,0	8,6	±0,6	10,0	9,0	9,0	9,3	±0,6
Extrato Metanólico	40	12,0	8,0	8,0	9,3	±2,3	8,0	8,0	8,0	8,0	±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	12,0	8,0	8,0	9,3	±2,3	8,0	8,0	9,0	8,3	±0,6	8,0	8,0	8,0	8,0	±0,0	9,0	8,0	8,0	8,3	±0,6
Ext. Ac.Etila	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Clorofór.	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Comercial	40	15,0	14,0	15,0	14,6	±0,6	11,0	11,0	12,0	11,3	±0,6	9,0	9,0	10,0	9,3	±0,6	9,0	9,0	10,0	9,3	±0,6
	60	14,0	13,0	15,0	14,0	±1,0	12,0	11,0	12,0	11,6	±0,6	9,0	9,0	9,0	9,0	±0,0	11,0	10,0	10,0	10,3	±0,6
EtOH Puro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH Puro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: A: repetição a B: repetição b C: repetição c M: média DP: desvio-padrão - não inibiu Diâmetro do disco: 7 mm

Tabela 2A – Diâmetro médio e desvio-padrão dos halos de inibição, em milímetros, do crescimento de amostras de *Staphylococcus sp.* (Coagulase negativos) determinados pelos diferentes extratos de própolis (1g/10mL)

Extratos	Vol μL	<i>Staphylococcus sp.</i> Fundão I					<i>Staphylococcus sp.</i> Fundão II					<i>Staphylococcus sp.</i> UFV					<i>Staphylococcus sp.</i> P.Firme				
		A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP
Extrato Aquoso	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Etanólico	40	9,0	9,0	9,0	9,0	± 0,0	9,0	8,0	8,0	8,3	± 0,6	11,0	9,0	9,0	9,6	± 1,2	10,0	8,0	8,0	9,3	± 1,2
	60	10,0	9,0	9,0	9,3	± 0,6	9,0	8,0	8,0	8,3	± 0,6	13,0	9,0	9,0	10,3	± 2,3	10,0	9,0	8,0	9,0	± 1,0
Extrato Metanólico	40	9,0	8,0	-	8,5	± 0,7	-	8,0	8,0	8,0	± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	9,0	8,0	8,0	8,3	± 0,6	8,0	8,0	8,0	8,0	± 0,0	-	-	-	-	-	8,0	8,0	8,0	8,0	± 0,0
Ext. Ac.Etila	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Clorofór.	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Comercial	40	9,0	9,0	9,0	9,0	± 0,0	9,0	9,0	10,0	9,3	± 0,6	10,0	9,0	9,0	9,3	± 0,6	12,0	9,0	10,0	10,3	± 1,5
	60	11,0	9,0	9,0	9,6	± 1,2	9,0	10,0	9,0	9,3	± 0,6	12,0	9,0	9,0	10,0	± 1,7	12,0	9,0	9,0	10,0	± 1,7
EtOH Puro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH Puro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: A: repetição a B: repetição b C: repetição c M: média DP: desvio-padrão - não inibiu Diâmetro do disco: 7 mm

Tabela 3A – Diâmetro médio e desvio-padrão dos halos de inibição, em milímetros, do crescimento de amostras de *Streptococcus agalactiae* determinados pelos diferentes extratos de própolis (1g/10mL)

Extratos	Vol μL	<i>S. agalactiae</i> UFV II					<i>S. agalactiae</i> P.Firme I					<i>S. agalactiae</i> P.Firme II					<i>S. agalactiae</i> P.Firme III				
		A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP
Extrato Aquoso	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Etanólico	40	13,0	13,0	10,0	12,0	± 1,7	17,0	13,0	13,0	14,3	± 2,3	13,0	12,0	12,0	12,3	± 0,6	14,0	14,0	13,0	13,6	± 0,6
	60	13,0	13,0	11,0	12,3	± 1,2	18,0	13,0	12,0	14,3	± 3,2	14,0	13,0	11,0	12,6	± 1,5	15,0	14,0	13,0	14,0	± 1,0
Extrato Metanólico	40	8,0	9,0	8,0	8,3	± 0,6	-	-	-	-	-	12,0	10,0	11,0	11,0	± 1,0	8,0	8,0	8,0	8,0	± 0,0
	60	8,0	8,0	8,0	8,0	± 0,0	-	-	-	-	-	12,0	11,0	10,0	11,0	± 1,0	8,0	9,0	8,0	8,3	± 0,6
Ext. Ac.Etila	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Clorofór.	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Comercial	40	12,0	13,0	13,0	12,6	± 0,6	17,0	15,0	15,0	15,6	± 1,1	14,0	14,0	12,0	13,3	± 1,1	15,0	13,0	15,0	14,3	± 1,1
	60	14,0	14,0	14,0	14,0	± 0,0	17,0	15,0	14,0	15,3	± 1,5	14,0	13,0	13,0	13,3	± 0,6	16,0	14,0	15,0	15,0	± 1,0
EtOH Puro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOHPuro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: A: repetição a B: repetição b C: repetição c M: média DP: desvio-padrão - não inibiu
Diâmetro do disco: 7 mm

Tabela 4A – Diâmetro médio e desvio-padrão dos halos de inibição, em milímetros, do crescimento de amostras de Coliformes determinados pelos diferentes extratos de própolis (1g/10mL)

Extratos	Vol μL	Coliforme UFV					Coliforme Viçosa I					Coliforme Viçosa III				
		A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP	A	B	C	M	DP
Extrato Aquoso	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Etanólico	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Metanólico	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ext. Ac.Etila	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ext. Clorform.	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato Comercial	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EtOH Puro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH Puro	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: A: repetição a B: repetição b C: repetição c M: média
 DP: desvio-padrão - não inibiu Diâmetro do disco: 7 mm

APÊNDICE B

Tabela 1B - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Viçosa I, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 70% (EEP-70). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 70% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	3,26x10 ⁹	9,51	3,26x10 ⁹	-	9,51	3,26x10 ⁹	-	9,51
0	2,4x10 ⁹	9,38	1,15x10 ⁶	100	6,06	1,12x10 ⁶	100	6,05
6	7,63x10 ⁹	9,88	6,96x10 ³	0,6	3,84	1,18x10 ⁵	10,53	5,07
12	1,8x10 ¹¹	11,25	1,65x10 ³	0,14	3,28	9,08x10 ⁴	8,11	4,96
24	1,62x10 ¹¹	11,21	5,86x10 ²	0,05	2,77	2,61x10 ⁴	2,33	4,42

Tabela 2B - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Viçosa I, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 80% (EEP-80). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 80% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	3,26x10 ⁹	9,51	3,26x10 ⁹	-	9,51	3,26x10 ⁹	-	9,51
0	2,4x10 ⁹	9,38	2,93x10 ⁵	100	5,46	9,63x10 ⁵	100	5,98
6	7,63x10 ⁹	9,88	6,66x10 ³	2,27	3,82	7,16x10 ⁴	7,43	4,85
12	1,8x10 ¹¹	11,25	2,03x10 ³	0,7	3,31	5,72x10 ⁴	5,94	4,76
24	1,62x10 ¹¹	11,21	6,05x10 ²	0,21	2,78	1,21x10 ⁵	12,5	5,08

Tabela 3B - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Viçosa I, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 95% (EEP-95). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 95% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
inóculo	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
0	3,26x10 ⁹	9,51	3,26x10 ⁹	-	9,51	3,26x10 ⁹	-	9,51
0	2,4x10 ⁹	9,38	3,5x10 ⁵	100	5,54	8,0x10 ⁵	100	5,9
6	7,63x10 ⁹	9,88	1,1x10 ⁴	3,14	4,04	5,06x10 ⁵	63,25	5,7
12	1,8x10 ¹¹	11,25	1,1x10 ⁴	3,14	4,04	1,75x10 ⁵	21,87	5,24
24	1,62x10 ¹¹	11,21	2,0x10 ³	0,57	3,3	6,05x10 ⁴	7,56	4,78

APÊNDICE C

Tabela 1C - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira II, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 70% (EEP-70). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 70% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	1,3x10 ¹⁰	10,11	1,3x10 ¹⁰	-	10,11	1,3x10 ¹⁰	-	10,11
0	6,4x10 ⁸	8,8	9,26x10 ⁵	100	5,96	1,09x10 ⁶	100	6,03
6	6,39x10 ⁹	9,8	3,65x10 ³	0,39	3,56	1,4x10 ⁴	1,28	4,14
12	1,4x10 ¹⁰	10,15	1,35x10 ³	0,15	3,13	4,53x10 ⁵	41,56	5,65
24	2,33x10 ¹⁰	10,37	5,25x10 ³	0,57	3,72	9,16x10 ³	0,84	3,96

Tabela 2C - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira II, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 80% (EEP-80). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 80% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	1,3x10 ¹⁰	10,11	1,3x10 ¹⁰	-	10,11	1,3x10 ¹⁰	-	10,11
0	6,4x10 ⁸	8,8	6,75x10 ⁵	100	5,83	9,31x10 ⁵	100	5,96
6	6,39x10 ⁹	9,8	4,25x10 ³	0,63	3,63	2,14x10 ⁴	2,3	4,33
12	1,4x10 ¹⁰	10,15	1,33x10 ³	0,2	3,12	1,5x10 ⁴	1,61	4,17
24	2,33x10 ¹⁰	10,37	1,1x10 ³	0,16	3,04	1,0x10 ⁴	1,07	4,0

Tabela 3C - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira II, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 95% (EEP-95). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 95% (mg/mL)								
	Controle		3,0			2,0			
Inóculo	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log	
0	1,3x10 ¹⁰	10,11	1,3x10 ¹⁰	-	10,11	1,3x10 ¹⁰	-	10,11	
0	6,4x10 ⁸	8,8	2,8x10 ⁴	100	4,45	9,7x10 ⁴	100	4,98	
6	6,39x10 ⁹	9,8	2,51x10 ³	8,96	3,4	2,08x10 ⁴	21,44	4,32	
12	1,4x10 ¹⁰	10,15	5,42x10 ³	19,36	3,73	3,72x10 ⁴	38,35	4,57	
24	2,33x10 ¹⁰	10,37	4,46x10 ³	15,93	3,65	1,65x10 ⁴	17,01	4,22	

APÊNDICE D

Tabela 1D - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira III, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 70% (EEP-70). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 70% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	1,26x 10 ⁹	9,1	1,26x 10 ⁹	-	9,1	1,26x 10 ⁹	-	9,1
0	1,74x10 ⁸	8,24	5,5x10 ⁵	100	5,74	1,03x10 ⁶	100	6,01
6	1,39x10 ⁹	9,14	4,0x10 ¹	0,007	1,6	2,0x10 ³	0,19	3,3
12	5,94x10 ⁹	9,77	0	0	0	0	0	0
24	2,88x10 ¹⁰	10,46	0	0	0	0	0	0

Tabela 2D - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira III, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 80% (EEP-80). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 80% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	1,26x 10 ⁹	9,1	1,26x 10 ⁹	-	9,1	1,26x 10 ⁹	-	9,1
0	1,74x10 ⁸	8,24	3,43x10 ⁵	100	5,53	3,23x10 ⁵	100	5,51
6	1,39x10 ⁹	9,14	3,36x10 ²	0,098	2,52	5,66x10 ²	0,175	2,75
12	5,94x10 ⁹	9,77	0	0	0	0	0	0
24	2,88x10 ¹⁰	10,46	0	0	0	0	0	0

Tabela 3D - Análise da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus*, amostra Teixeira III, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 95% (EEP-95). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 95% (mg/mL)							
	Controle		3,0			2,0		
inóculo	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
	1,26x 10 ⁹	9,1	1,26x 10 ⁹	-	9,1	1,26x 10 ⁹	-	9,1
0	1,74x10 ⁸	8,24	1,8x10 ⁵	100	5,25	1,44x10 ⁵	100	5,16
6	1,39x10 ⁹	9,14	0	0	0	0	0	0
12	5,94x10 ⁹	9,77	0	0	0	0	0	0
24	2,88x10 ¹⁰	10,46	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE E

Tabela 1E - Análise da susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae*, amostra UFV II, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 70% (EEP-70). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 70% (mg/mL)							
	Controle		0,43			0,3		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	1,54x10 ⁹	9,18	1,54x10 ⁹	-	9,18	1,54x10 ⁹	-	9,18
0	3,37x10 ⁷	7,53	4,48x10 ⁹	100	6,65	5,81x10 ⁶	100	6,76
6	4,0x10 ⁹	9,6	1,4x10 ⁵	3,12	5,15	6,32x10 ⁵	10,87	5,8
12	7,18x10 ⁹	9,86	1,33x10 ¹	0,0003	1,12	3,0x10 ²	0,005	2,48
24	8,24x10 ⁹	9,91	0	0	0	0	0	0

Tabela 2E - Análise da susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae*, amostra UFV II, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 80% (EEP-80). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 80% (mg/mL)							
	Controle		0,43			0,3		
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
inóculo	1,54x10 ⁹	9,18	1,54x10 ⁹	-	9,18	1,54x10 ⁹	-	9,18
0	3,37x10 ⁷	7,53	5,31x10 ⁶	100	6,72	6,7x10 ⁶	100	6,83
6	4,0x10 ⁹	9,6	2,0x10 ¹	0,0003	1,3	2,98x10 ³	0,044	3,47
12	7,18x10 ⁹	9,86	0	0	0	6,3x10 ²	0,0094	2,8
24	8,24x10 ⁹	9,91	0	0	0	0	0	0

Tabela 3E - Análise da susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae*, amostra UFV II, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 95% (EEP-95). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 95% (mg/mL)							
	Controle		0,43			0,3		
inóculo	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
	1,54x10 ⁹	9,18	1,54x10 ⁹	-	9,18	1,54x10 ⁹	-	9,18
0	3,37x10 ⁷	7,53	1,15x10 ⁷	100	7,06	1,43x10 ⁷	100	7,15
6	4,0x10 ⁹	9,6	4,21x10 ⁴	0,36	4,62	2,0x10 ⁵	1,4	5,3
12	7,18x10 ⁹	9,86	0	0	0	0	0	0
24	8,24x10 ⁹	9,91	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE F

Tabela 1F - Análise da susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae*, amostra ES-T I, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 70% (EEP-70). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 70% (mg/mL)								
	Controle		0,43			0,3			
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log	
Inóculo	3,0x10 ⁸	8,48	3,0x10 ⁸	-	8,48	3,0x10 ⁸	-	8,48	
0	1,17x10 ⁸	8,06	9,54x10 ⁴	100	4,98	4,0x10 ⁴	100	4,6	
6	1,07x10 ⁸	8,03	2,91x10 ²	0,3	2,46	2,96x10 ²	0,74	2,47	
12	7,07x10 ⁸	8,84	0	0	0	3,66x10 ¹	0,091	1,56	
24	5,51x10 ⁸	8,74	0	0	0	0	0	0	

Tabela 2F - Análise da susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae*, amostra ES-T I, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 80% (EEP-80). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 80% (mg/mL)								
	Controle		0,43			0,3			
	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log	
inóculo	3,0x10 ⁸	8,48	3,0x10 ⁸	-	8,48	3,0x10 ⁸	-	8,48	
0	1,17x10 ⁸	8,06	2,56x10 ⁴	100	4,4	3,8x10 ⁴	100	4,58	
6	1,07x10 ⁸	8,03	2,6x10 ²	1,01	2,41	0	0	0	
12	7,07x10 ⁸	8,84	0	0	0	0	0	0	
24	5,51x10 ⁸	8,74	0	0	0	0	0	0	

Tabela 3F - Análise da susceptibilidade do *Streptococcus agalactiae*, amostra ES-T I, ao extrato etanólico de própolis, extraído por álcool 95% (EEP-95). Contagem de células viáveis (UFC/mL – log₁₀) e porcentagens de bactérias viáveis por tempo de incubação

Tempo (h)	Concentrações de EEP 95% (mg/mL)							
	Controle		0,43			0,3		
inóculo	UFC/mL	Log	UFC/mL	%	Log	UFC/mL	%	Log
	3,0x10 ⁸	8,48	3,0x10 ⁸	-	8,48	3,0x10 ⁸	-	8,48
0	1,17x10 ⁸	8,06	6,37x10 ⁴	100	4,8	5,82x10 ⁴	100	4,76
6	1,07x10 ⁸	8,03	3,33x10 ¹	0,052	1,52	6,33x10 ²	1,08	2,8
12	7,07x10 ⁸	8,84	0	0	0	0	0	0
24	5,51x10 ⁸	8,74	0	0	0	0	0	0