

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

TORQUATO MARQUES DOS SANTOS NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS
VERDE FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS* SPP ISOLADOS DE
MASTITE CAPRINA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadores: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

RECIFE

2007

TORQUATO MARQUES DOS SANTOS NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE
FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS* SPP ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA

Dissertação apresentada à Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência Veterinária,
para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientatdores: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

RECIFE

2007

TORQUATO MARQUES DOS SANTOS NETO

Avaliação da atividade antimicrobiana da própolis verde frente à *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM: 27 de fevereiro de 2007

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto – DMFA – UFRPE

Membros Titulares:

Prof^a Dr^a Keila Aparecida Moreira – Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Prof^a Dr^a Leonie Asfora Sarubbo – Departamento de Química – UNICAP

Prof^a Dr^a Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares – DMFA - UFRPE

AGRADECIMENTOS

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

À Professora Ana Lúcia Figueiredo Porto por toda orientação, paciência e dedicação fundamentais para a conclusão deste curso de mestrado.

Aos animais, razão para a realização deste estudo.

Ao LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, por toda a estrutura física e humana oferecida, possibilitando a execução deste projeto.

Ao Professor José Luíz Lima Filho, diretor do LIKA, por ter permitido que fossem utilizadas as instalações e equipamentos para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Rinaldo Aparecido Mota, por sua co-orientação, idéias e sugestões elucidadoras.

Ao professor Leonildo Bento Galiza da Silva, por sua co-orientação, sugestões e ajuda nos momentos que necessitei.

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

Ao Laboratório Pharma Néctar Cytopropolis pela doação da própolis necessária à realização do experimento.

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

Aos professoras Keila Aparecida Moreira, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares e Leonie Asfora Sarubbo pelas sugestões oportunas e engrandecedoras ao trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Áurea Wischral, coordenadora do curso de pós-graduação, pelo o apoio e ajuda fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao amigo e Prof. Edgar Silveira, pela sua contribuição fundamental na análise estatística deste estudo.

Aos meus amigos, pela valiosa contribuição através dos seus conhecimentos, idéias e amizade, fundamentais para a realização do experimento de dissertação.

Aos professores da Pós-graduação, pela amizade, ajuda e informações repassadas ao longo do curso de Mestrado em Ciência Veterinária. Serei eternamente grato.

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

Aos funcionários da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela ajuda fundamental ao término do experimento, incentivo e amizade.

À direção do estábulo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela permissão para coleta do experimento neste local.

Aos produtores e suas famílias que permitiram, com a hospitalidade sempre grandiosa e peculiar ao homem do campo, a coleta das amostras de leite caprino utilizadas no experimento.

A secretária do curso de pós-graduação a Sra. Edna Cherias, por sua ajuda e dedicação para a solução dos assuntos concernentes às questões sócio-educativas.

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

“O tempo muito nos ensinou. Esnsinou a amar a vida, não desistir da luta, recomeçar na derrota, renunciar as palavras e pensamento negativo, enfim, acreditar nos valores humanos. Ser otimista!!!”

(Cora Coralina)

RESUMO

A mastite é o processo inflamatório de origem infecciosa ou não, que acomete as diferentes estruturas da glândula mamária. Caracteriza-se por alterações físico-químicas e bacteriológicas do leite e lesões irreparáveis no tecido mamário. Em cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grave problema, tanto por aumentar os custos da produção quanto pelos riscos à saúde pública. Objetivou-se com este estudo isolar e identificar os microrganismos envolvidos nas mastites clínicas e subclínicas em cabras, determinar o perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus* spp frente a diferentes antimicrobianos além de avaliar a atividade antimicrobiana determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e avaliar o efeito bactericida e bacteriostático da própolis verde. Foram utilizadas 90 cabras em lactação, com mastite clínica ou subclínica, constituindo um total de 180 metades mamárias. As amostras de leite que foram submetidas ao exame microbiológico para isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa que foram submetidos a testes de sensibilidade frente a 13 diferentes antimicrobianos e, às frações etanólica e aquosa do extrato de própolis verde cedidos pelo laboratório Necta-Farmacêutica[®], utilizando a técnica de difusão em disco. Foi constatada a presença de mastite clínica e sub-clínica no rebanho caprino dos municípios estudados, e dentre os isolados a partir das amostras de leite de animais com mastite, foram isoladas colônias de *Staphylococcus* spp. De acordo com a avaliação feita com os antibióticos utilizados no tratamento de mastites a cefalotina 30µg e a tetraciclina 30µg demonstraram maior eficácia frente a estes isolados com um índice de 95,56% de sensibilidade. Comparando-se os valores dos halos de inibição obtidos das frações aquosa e etanólica, constatou-se que houve diferença significativa entre eles ($p < 0,01$), sugerindo que a formulação exerceu atividade antimicrobiana nos casos estudados. Foi determinada a concentração inibitória mínima de 100 mg/mL obtendo-se efeito bactericida para todas as amostras testadas. Sugere-se, a partir dos resultados obtidos que a própolis verde, pode

ser utilizada como um tratamento alternativo para mastite caprina causada por *Staphylococcus* spp, por ter demonstrado eficácia *in vitro* quanto ao efeito bactericida nos isolados testados.

ABSTRACT

The mastitis is the inflammatory process of infectious origin or not, that reaches the different structures of the mammary gland. It is characterized by alterations physical-chemistries and bacteriological of the milk and irreparable lesions in the mammary fabric. In goats explored for the production of milk, the mastitis is a serious problem, so much for increasing the costs of the production as for the risks to the public health. It was aimed at to evaluate clinicamente the animals, with relationship to the presence or not of mastites; To isolate and to identify the microorganisms found in the milk of the appraised animals; to determine the susceptibilitie of the isolated front to different antibiotics used in the mastitis treatment; to evaluate the antimicrobial activity of the propolis green in vitro; to determine the concentration minimum inhibitory (CMI) of the green propolis; to evaluate the bactericidal effect and bacteriostatic of the green propolis. As experimental unit was established the use of the goat mammary half, for they be independent anatomically could present different infections. Initially 90 goats were selected in nursing, presenting clinical mastite or subclinical, constituting a lot of 180 (hundred and eighty) affected mammary half for the disease. Samples of goat milk of some located properties were collected in the districts of Arcoverde, Brejo da Madre de Deus, Garanhuns, Jaboaão do Guararapes, Paudalho, Olinda, Pedra and São Lourenço, State of Pernanbuco; identified the microorganisms, isolated the colonies of *Staphylococcus* spp, the susceptibilitie was evaluated from the isolated front to different antibiotics used in the mastitis treatment (cefalotyne 30µg, gentamicyne 10µg, penicillyne G 10UI, sulfazotrim 25µg, tetracicyne 30µg, neomicyne 30 µg, nitrofurantoyne 300 µg, ampicilyne 10µg, amoxicilyne 10µg, estreptomicyne 10µg, kanamicyne 30µg, lincomicyne 2µg and clorafenicol 30µg) and to the etanolics fractions and aqueous of the extracts of green propolis given in by the laboratory Necta-Farmacêutica®, for the diffusion methodology in disk.

They were also certain the concentration minimum inhibitory - CIM and bactericidal effect and bacteriostatic. The presence of clinical mastite was verified and it sub-practices medicine in the goat flock of the studied districts, and among the isolated ones starting from them sample of milk of animals with mastitis, form isolated colonies of *Staphylococcus* spp. In agreement with the evaluation done with the antibiotics used in the mastitis treatment the cefalotyne 30µg and the tetracycline 30µg they demonstrated larger efficiency front to these isolated with an index of 95.56% of sensibility. Being compared the values of the obtained inhibition halus of the aqueous fractions and etanolic, it was verified that there was significant difference among them ($p < 0.01$), suggesting that the formulation exercised activity antimicrobial in the studied cases. It was certain the concentration minimum inhibitory of 100 mg/mL being obtained bactericidal effect in all the tested samples. It is suggested that obtained with the green propolis starting from the results, this can be used as an alternative treatment for goat mastitis, for having demonstrated efficiency with relationship to the bactericidal effect in the isolated ones tested.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Valor nutritivo entre o leite de cabra e de outras espécies de animais..... 15
- Figura 2 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição) da fração alcoólica (♦) e aquosa (▪) (15% m/v) da própolis verde frente aos isolados de *Staphylococcus* spp de mastite caprina de rebanhos de 08 municípios do Estado de Pernambuco..... 79
- Figura 3 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição) da fração alcoólica (♦) e aquosa (▪) da própolis verde (diluição 1:2 m/v) frente aos isolados de *Staphylococcus* spp de mastite caprina de rebanhos 08 municípios do Estado de Pernambuco..... 79
- Figura 4 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição) da fração alcoólica (♦) e aquosa (▪) da própolis verde (diluição 1:4 m/v) frente aos isolados de *Staphylococcus* spp de mastite caprina de rebanhos de 08 municípios do Estado de Pernambuco..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp, coagulase positivos e negativos de amostras de leite caprino com mastite nas 19 propriedades de municípios do Estado de Pernambuco, 2006.....	62
--	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Mastite.....	18
2.2 <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
2.3 Própolis.....	24
2.3.1 Composição da própolis no Brasil e uso terapêutico.....	26
2.3.1.1 Atividade antioxidante.....	27
2.3.1.2 Atividade antiinflamatória.....	28
2.3.1.3 Atividade antineoplásica.....	29
2.3.1.4 Atividade antibacteriana.....	29
3. REFERÊNCIAS.....	36
4. OBJETIVOS.....	51
4.1 Objetivo Geral.....	51
4.2 Objetivos específicos.....	51
CAPÍTULO 1- PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP ISOLADOS DE LEITE DE CABRAS COM MASTITE EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO.....	52
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

CAPITULO 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS* SPP ISOLADOS DE MASTITE

CAPRINA.....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1 Seleção dos animais.....	75
2.2 Isolamento e identificação.....	75
2.3 Preparo das soluções contendo própolis verde.....	76
2.4 Teste de atividade antimicrobiana da própolis verde.....	76
2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	77
2.6 Análise Estatística.....	78
3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	78
4. CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

O leite de cabra é rico em vitaminas e dada a sua composição facilmente digerido pelo organismo, é indicado na alimentação de crianças com problemas de digestão de gorduras de produtos de origem animal. É uma das mais importantes fontes de cálcio, fósforo, vitamina A e vitamina D, podendo ser consumido por pessoas alérgicas ao leite de vaca. As pessoas convalescentes, crianças e idosos com problemas ósseos, e também quem gosta de saborear um bom leite, tem no leite de cabra estas importantes propriedades (EMBRAPA, 2007/a).

A produção nacional do leite de cabra é de 22.000 litros/dia. A região Nordeste produz diariamente, 45,4% da produção nacional, cerca de 9.988 litros. (EMBRAPA, 2007/b).

Dada a sua constituição, o leite (figura 01) proporciona condições ideais para o crescimento bacteriano, podendo causar problema de saúde (MENDES et al., 1995).

Em 100g de leite	calorias	Em gramas			Em miligramas							
		Umidade	Proteína	lipídios	Minerais			Vitaminas				
					Ca	P	Fe	B1	B2	B3	C	
Cabra	92	83,6	3,9	6,2	190	129	0,2	0,06	0,19	0,3	1	
Vaca	63	87,7	3,1	3,5	114	102	0,1	0,04	0,14	0,2	1	
Búfala	115	81,0	5,2	8,7	210	101	0,1	0,04	0,16	0,1	1	

Fonte: EMBRAPA, 2007/b

Figura 1 – Valor nutritivo entre o leite de cabra e de outras espécies

A mastite é considerada a principal enfermidade do ponto de vista econômico, dentre as patologias que afetam os animais domésticos, principalmente aqueles produtores de leite, por causar perdas resultantes do descarte do leite, morte precoce dos animais, custo com drogas, serviço especializado e aumento da mão de obra, além de reduzir a quantidade e

qualidade do leite e derivados (MOTA, 1999). A estimativa do custo para o tratamento da mastite em caprinos chega a R\$ 8,60 com a aquisição de medicamentos e mão de obra (PINHEIRO et al., 2002).

A mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária independente da causa, caracterizando-se por uma série de alterações físicas e químicas do leite bem como modificações patológicas no tecido glandular. As transformações mais importantes são a descoloração, o aparecimento de coágulos e o aumento na contagem de leucócitos no leite. A glândula mamária apresenta aumento de volume, elevação de temperatura, dor e endurecimento (RADOSTITIS et al., 2002).

Nas mastites, os agentes etiológicos são predominantemente bacterianos (CORRÊA e CORRÊA, 1992), sendo as espécies do gênero *Staphylococcus* os principais envolvidos em todas as formas de mastite caprina. Embora o *S. aureus* seja considerado o patógeno principal, as espécies coagulase-negativas de *Staphylococcus* são mais comumente observadas, principalmente nas mastites sub-clínicas (CASTRO et al., 1992; LIMA-JÚNIOR et al., 1993; CONTRERAS et al., 1995, 1999; BEDIDI-MADANI et al., 1998).

O controle e as medidas preventivas contra a mastite caprina são similares àquelas usadas para a mastite dos bovinos, incluindo pré e pós-desinfecção da teta na ordenha, terapia clínica, terapia seca e uso apropriado do equipamento de ordenha (POUTREL et al., 1997; MENZIES e RAMANOON, 2001).

O tratamento antibiótico é uma das alternativas recomendadas a fim de reduzir a infecção intramamária e, conseqüentemente, a prevalência da mastite no rebanho (BRITO e BRITO, 1998). Entretanto, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos para o tratamento da mastite ou de qualquer outra infecção pode gerar um aumento do nível de resistência de muitos microrganismos a estas drogas (CONTRERAS et al., 1995). Assim, o conhecimento dos agentes bacterianos responsáveis por infecções, bem como seu perfil de susceptibilidade às drogas deve melhorar as taxas de cura e reduzir a resistência bacteriana (SILVA et al., 2004).

Existe uma necessidade de se descobrir novos antibióticos especialmente aqueles de amplo espectro para bactérias resistentes, anaeróbios, patógenos oportunistas, vírus e fungos (VANDAMME, 1984).

Os produtos apícolas vêm sendo utilizados na terapia de várias doenças, com a finalidade de alcançar maior eficiência, menor toxicidade e menores efeitos colaterais (MARCUCCI, 1995).

A própolis revela-se como uma alternativa natural para o tratamento das mastites infecciosas, uma vez que vários trabalhos científicos *in vitro* destacam a sua atividade antibacteriana (SANTOS et al., 2002; GAREDEW et al., 2004; ORSI et al., 2005).

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

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

Dentre os produtos apícolas, como mel e geléia real, a própolis vem se destacando pelas suas propriedades terapêuticas: atividades antimicrobianas, antiinflamatórias, cicatrizantes, anestésicas, anticariogênica e anticancerígena. Possui ainda outras ações como antiprotozoária, antitripanocida e citotóxica *in vitro* (MARCUCCI, 1995).

Neste sentido, cabe uma maior investigação sobre a utilização da própolis verde frente a isolados de *Staphylococcus* spp de mastite caprina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite

Em função do número e do tipo de microrganismos presentes no leite, alterações indesejáveis na aparência, sabor ou odor podem causar prejuízos, comprometendo, além do rendimento industrial, a vida de prateleira do produto e causando redução das suas propriedades nutritivas, interferindo na qualidade final dos produtos industrializados (CASSOLI, 2005).

A qualidade do leite assume destacada importância sob o ponto de vista de saúde pública, por ser um excelente meio para crescimento e suporte de agentes potencialmente patogênicos ao homem, sendo freqüentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos, originários de contaminação pós-ordenha ou de infecções do próprio animal, em especial a mastite (NICOLETTI, 1987; ANUÁRIO MILKBIZZ, 1999).

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

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

Os prejuízos econômicos causados pela mastite em cabras exploradas para a produção de leite, aliados às questões de saúde pública, tornam a doença uma das maiores preocupações da Medicina Veterinária, por várias razões: epidemiologia abrangente, ser de causa plurietiológica e apresentar controle

complexo na dependência dos agentes envolvidos e do meio ambiente no qual os animais são criados (BALABAN e RASOOLY, 2000).

Na região Nordeste, sinais clínicos de mastite foram relatados em 51,2% dos rebanhos (PINHEIRO et al., 2000); de um modo geral, os casos de mastite clínica em caprinos são pouco freqüentes (CREMOUX e MENARD, 1996), variando entre 0 a 2% (CONTRERAS et al., 1999).

No Rio Grande do Sul, 30,8% de metades mamárias avaliadas foram positivas para mastite subclínica. Esta forma representa um problema diagnóstico, principalmente em regiões onde não se dispõe de pessoal e equipamentos especializados, uma vez que a grande quantidade de células epiteliais e partículas anucleadas presentes no leite interferem significativamente nos testes de rotina utilizados para detectar a forma subclínica da doença (PERRIN et al., 1997; MURICY et al., 2003).

À medida que o grau de inflamação aumenta, a síntese de leite diminui e a composição química tende a se aproximar daquela do sangue, porque os componentes são transferidos da circulação sangüínea para a glândula mamária (BRITO e BRITO, 1998).

No caso de infecção das glândulas mamárias, a defesa ocorre por imunidade natural através de barreiras físicas e reações celulares, e por imunidade artificialmente adquirida, através de vacinas (HOMAN e WALTIAUX, 1996).

O acúmulo local de células do sistema imunológico e o aumento de CD8+ próximo ao epitélio, sugerem um papel de defesa imune local (SALMON, 1987; CHABEAUDIE et al., 1993). Com relação às células presentes no leite, existem células epiteliais, fragmentos de hemácias, granulócitos representados por neutrófilos e eosinófilos, linfócitos e macrófagos (SCHOLLENBERGER et al., 1986).

Assim, um importante fator para a secreção láctea é a saúde do animal, estando o organismo doente, a produção de leite é reduzida (KOLB, 1987). Essa redução é um dos sintomas mais evidentes da mastite e depende do grau de

inflamação. Segundo Korhonen e Kaartien (1995), esta pode ser estimada a partir da contagem de células somáticas (CCS) no leite.

Segundo Andrade e colaboradores (2001) o termo células somáticas abrange diferentes elementos celulares normalmente presentes no leite, compreendendo células de defesa do organismo e células epiteliais de descamação, que aumentam no caso das mastites, principalmente as de origem bacteriana.

A enumeração das células presentes no leite é uma boa forma de acompanhar o estado sanitário do úbere, além de indicar possíveis reduções na produção de leite e alterações na sua composição físico-química (Andrade et al., 2001).

A determinação da Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite é um método convencional e amplamente usado para o diagnóstico da mastite subclínica em regiões de bovinocultura leiteira desenvolvida. É também o parâmetro mais empregado para avaliação da qualidade higiênica do leite, além de ser um instrumento valioso para avaliação e monitorização da mastite nos rebanhos (BRITO et al., 1997). A utilização desta metodologia em caprinos, entretanto, ainda é controversa. Nesta espécie, a CCS é maior que em bovinos (normalmente milhões/mL) tanto em úberes infectados como em sadios (GUS e ACE, 1998) e em todo o rebanho há uma proporção considerável de animais com alta CCS (SCHULZ, 1994).

A mastite geralmente contribui para o aumento da atividade enzimática e bioquímica no leite. Algumas dessas características têm sido usadas como recurso diagnóstico dessa doença como a pesquisa de catalase e NAGase (BRITO e BRITO, 1998).

Vários estudos têm indicado e confirmado diferenças fisiológicas e microbiológicas entre a glândula mamária caprina e a bovina, demonstrando que devem ser realizadas adaptações para caprinos, dos testes diagnósticos empregados em leite bovino (SILVA et al., 1996; PERRIN et al., 1997).

2.2. *Staphylococcus* spp.

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para a saúde pública. A toxina é termoestável, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência da intoxicação (ALCARÃS et al., 1997).

De acordo com Associação de Saúde Pública Americana (1995), o seu modo de transmissão se dá pela ingestão de um alimento contendo a enterotoxina estafilocócica. Alimentos manipulados por pessoas portadoras do patógeno em secreções nasofaríngeas ou com ferimentos nas mãos, abscessos ou acnes; ou produtos de origem animal contaminados, que não foram cozidos ou refrigerados adequadamente, permanecendo em temperatura ambiente por determinado tempo permite a multiplicação do microrganismo e a produção da enterotoxina termoestável. Superfícies e equipamentos contaminados pode ser também a causa de intoxicações.

Os estafilococos são bactérias Gram positivas, imóveis, de forma esférica, medindo de 0,5 a 1,0 μ m, agrupadas em massas irregulares em forma de "cacho". Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias e anaeróbias facultativas. Podem crescer em temperaturas de 7 a 48°C, tendo como temperatura ótima de 30° a 37°C (BERGEY'S, 1994).

O gênero *Staphylococcus* é o agente responsável por aproximadamente 45% das toxiinfecções no mundo. A contaminação com *Staphylococcus* spp., pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana. Em condições favoráveis de temperatura, o microrganismo cresce, podendo produzir toxinas. O controle das enterotoxioses é possível desde que se observem as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos, pois a

proteção contra esta enfermidade é considerada uma obrigação dos profissionais das áreas de alimentos e de saúde (STANFORD et. al, 2006).

O *S. capitis* é comumente encontrado em tetas e leite de cabra e ovelhas com mastite (BAUTISTA et al.,1988) sendo isolado por Stanford e colaboradores (2006) no leite in natura.

Ribeiro e colaboradores (1999) através do cultivo microbiológico de amostras de leite caprino de fêmeas da raça Saanem e mestiças, sob ordenha manual, verificaram o predomínio de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa*.

Staphylococcus aureus é um Gram positivo, sendo que algumas cepas produzem uma toxina protéica altamente termoestável que causa a doença em humanos. A toxina é produto da multiplicação da bactéria nos alimentos deixados em temperaturas inadequadas (FDA/CFSAN, 2003). É um agente causal de mastite no rebanho leiteiro, podendo ser encontrado no leite, onde níveis elevados de contaminação podem ser rapidamente alcançados se as condições para a sua multiplicação forem favoráveis. Durante seu crescimento no leite, cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas estão aptas a produzir enterotoxinas termoestáveis, que quando ingeridas pelo homem causam náusea, vômito e diarréia (SILVA et al., 2000).

A patogenicidade do gênero *S. aureus*, é particularmente relacionada à larga produção das exoproteínas, incluindo a alfa, beta e delta-hemolisina que contribui pela sua habilidade de causar doenças em muitas espécies (SILVA et al., 2004).

Segundo o estudo realizado por Larsen e colaboradores (2000) algumas cepas de *Staphylococcus aureus* são mais contagiosas, virulentas ou persistentes que outras. Além disso, o *S. aureus* é freqüentemente resistente à terapia antibiótica devido a sua capacidade de produzir uma barreira de exopolissacarídeo e por causa de sua posição dentro dos micros abscessos, que limitam a ação das drogas (CONTRERAS et al., 2000). Os animais infectados por este microrganismo no leite apresentam uma fonte de infecção para o rebanho e um perigo à saúde pública (SILVA et al., 2004).

De acordo com Silva e colaboradores (2004), a falha na aplicação da terapia seca pode contribuir para a manutenção do *S. aureus* na glândula mamária das cabras. Por causa da sua patogenicidade, o *S. aureus* deve ser considerado um agente importante na mastite caprina sendo responsável pela mastite clínica e subclínica, bem como, pela elevada taxa de morbidade e mortalidade.

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

O uso de antibióticos durante a lactação pode diminuir ou eliminar a maioria dos sintomas clínicos da mastite, mas a cura microbiológica é pequena, principalmente quando o agente etiológico é o *Staphylococcus aureus* (RADOSTITS et al., 1994; WAAGE et al., 1999). Isto se deve às lesões que este microrganismo provoca no organismo animal, levando o sistema imunológico a criar um isolamento da área afetada, através dos leucócitos e tecido conjuntivo fibroso, formando abscessos e perda de função da parte lesada.

Periodicamente, a bactéria pode romper esta barreira e infectar tecidos saudáveis adjacentes, iniciando novamente o ciclo de infecção (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1998).

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

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

2.3. Própolis

De acordo com Park e colaboradores (1999) a origem do conhecimento do homem sobre as virtudes alimentícias, curativas e profiláticas dos produtos das abelhas é bastante curiosa e interessante. Praticamente todas as civilizações antigas com as suas terapias milenares conheceram e utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos na sua medicina. As histórias da medicina das civilizações Chinesa, Tibetana, Egípcia e também a Greco-Romana são ricas, todas contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas onde entram principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades.

Merece destaque a Bíblia Sagrada, oriunda da Civilização Hebraica que em alguns textos enaltece ao mesmo tempo em que enobrece as propriedades alimentícias e medicinais do mel. Outros textos referem-se à própolis que era conhecida como "O bálsamo de Gileade", era utilizada para curar feridas e atingia altos preços no mercado daquela época (PARK et al., 1999).

A própolis é recolhida de brotos e cascas de árvores ou de outras partes do tecido vegetal, pelas abelhas, que transportam até a colméia, onde adicionam e modificam sua composição, através de secreções próprias como a cera e secreções salivares essenciais ou, ainda, resultante do processo de digestão do pólen pelas abelhas (GHISALBERTI, 1979).

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

De acordo com Grange e Davey (1990) e Bonvehi e colaboradores (1994) é composta, em média por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen.

Conforme Castaldo e Capasso (2002), própolis é um remédio natural que tem sido largamente usado há muito tempo. Os egípcios sabiam muito bem das suas propriedades anti-putrefativas e as usavam no embalsamamento de cadáveres. Própolis era conhecida por médicos gregos e romanos tais como: Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno, dadas as suas propriedades médicas. Era usada como anti-séptico e cicatrizante naturais no tratamento de feridas, tendo sido usada na idade média e posteriormente por médicos árabes. Os incas a usavam como um agente anti-pirético.

A composição de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA et al., 2004), sua origem geográfica, concentração relativa de seus constituintes, período de coleta e variedades de abelhas *Apis mellifera* (SOUSA e BASTOS, 1999).

Segundo Bankova (2005), a amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas regiões temperadas, refletindo a diversidade vegetal destas regiões.

Vários compostos, principalmente polifenóis, já foram identificados em amostras de própolis (MARCUCCI et al., 1994). Estudos revelaram que a composição química é complexa, dentre os seus constituintes estão: os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), chalconas, ácido benzóico e derivados, benzaldeídos, álcoois, cetonas, fenólicos, heteroaromáticos, álcool cinâmicos e derivados, ácido caféico e derivados, ácidos diterpenos e triterpenos, minerais, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C e E (SOARES et al., 2000; SAHINLER e KAFTANOGLU, 2005), bem como diversos minerais manganês, ferro, cálcio, alumínio, aminoácidos e polissacarídeos (MARCUCCI, 1995).

A pinocembrina, galangina, acacetina, apigenina, quercetina, rutina, rhamnetina, chrisina e vanilina são os flavonóides mais encontrados e estudados (MATTOS et al., 1999). Lu e colaboradores (2004) afirmaram que cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, entre elas: hesperetina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina, kanferol etc. Como índice de qualificação de amostras de própolis é utilizado a presença e a concentração destes compostos.

De acordo com Aguiar (2005), os flavonóides são compostos fenólicos naturalmente encontrados em vegetais e amplamente consumidos na dieta humana e de animais, sendo capazes de modular a atividade de diferentes enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo assim que esses compostos possam ter significativas atividades biológicas, tais como: antihepatotóxica, antiinflamatória, antiosteoporótica, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, antiulcerativa e espasmolítica.

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

O primeiro relato da utilização de própolis no tratamento da mastite em bovinos, foi realizado pelos pesquisadores MIROLYUBOV e BARSKOV (1980).

2.3.1 Composição da Própolis no Brasil e Uso Terapêutico

Mattos e colaboradores (1999) relatam que os flavonoides mais encontrados em própolis extraídas e estudadas no Brasil são pinocembrina, galangina, acacetina, apigenina, quercetina, rutina, rhamnetina, chrisina e vanilina.

Dada a grande variabilidade de nossa flora, a composição química da própolis brasileira é extremamente complexa, diferente das regiões européias onde a principal fonte de resina é a *Populus nigra* (GARCIA-VIGUERA et al., 1992). Investigações sobre a própolis provinda da Venezuela (TOMÁS-BARBERANFÁN et al., 1993) e do Brasil (AGA et al., 1994) demonstraram ausência daqueles compostos polifenóis presentes nas amostras de própolis européias, como a pinocembrina. Porém, nestas amostras analisadas, existe uma alta concentração de ácido dihidrocinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides que caracterizam a própolis brasileira.

Podem ocorrer reações alérgicas à própolis, sendo relativamente rara (SANTOS et al., 1999). Uma possível reação pode ser uma resposta de hipersensibilidade (PAULINO, 1999). As ocorrências de anafilaxia e irritações

teciduais localizadas, decorrentes do contato com a própolis foram também constatadas (HASAN et al., 2005).

Burdock (1998) indica que a própolis apresenta baixa toxicidade, descrevendo suas doses toleráveis. Não foi observada nenhuma reação alérgica em 90 camundongos que receberam própolis por via enteral, na dose de 1400 mg/kg ao dia.

Conforme Park e colaboradores (2004), avaliações da atividade imunomodulatória da própolis indicaram um aumento no número de linfócitos CD4 e CD8 em camundongos tratados com o ester fenetílico do ácido caféico - CAPE, como também o estímulo na produção de anticorpos específicos (SFORCIN et al., 2005).

Diversos pesquisadores vêm propondo o emprego de ensaios biológicos, como também análises quantitativas de alguns compostos químicos das diferentes amostras de própolis, com o objetivo de estabelecer padrões que possibilitem definir qualitativamente a própolis a ser empregada como fitoterápico (POPOVA et al., 2005).

2.3.1.1 Atividade Antioxidante

A oxidação de um determinado elemento (biológico ou não biológico) está relacionada, principalmente, com a sua degradação e/ou deterioração. No corpo humano a oxidação está ligada ao processo de envelhecimento, mutação do material genético e degradação de tecido vivo. Os compostos responsáveis por essa ação maléfica são conhecidos como radicais livres. Recentemente, a própolis vem sendo estudada como alternativa para combater essa oxidação. A sua composição química, formada essencialmente por compostos fenólicos, leva a crer que estes possuam um grande poder antioxidante, uma vez que esses compostos são conhecidos como tais (PARK et al., 2004).

De acordo com Moreno e colaboradores (2000) o seqüestro de radicais livres gerados por neutrófilos poderia ser um mecanismo antioxidante da própolis, que resultaria em uma atividade antiinflamatória final. Em estudos *in vitro* verificou-

se que um dos compostos presentes na própolis, conhecido como CAPE, atua como um excelente antioxidante, inibindo a formação de radicais livres. A própolis inibiu em quase 95% a oxidação de uma mistura de reação formada por β -caroteno e ácido linoléico.

Marquele e colaboradores (2005) relatam sobre a propriedade da remoção de radicais livres em excesso do nosso organismo pela própolis, dada a sua composição. Alguns pesquisadores foram unânimes em atribuir aos flavonóides esta propriedade farmacológica (SUN et al., 2000).

2.3.1.2 Atividade Antiinflamatória

Alguns pesquisadores isolaram determinados compostos da própolis que apresentam conhecida atividade antiinflamatória. Mirzoeva e Calder (1996) atribuíram esta propriedade à presença de ácido caféico, quercetina, narigenina e éster fenílico do ácido caféico (CAPE). Esta atividade seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas de leucotrienos pelos macrófagos. A participação do CAPE isolado da própolis na inibição da síntese de prostaglandinas foi também constatada por Borrelli e colaboradores (2002). Além destes compostos, Krol e colaboradores (1996) caracterizaram na própolis outros 15 compostos que, conhecidamente, apresentam atividade antiinflamatória, entre eles o ácido salicílico, a epigenina, o ácido telúrico e a galangina.

A inibição na geração de óxido nítrico por macrófagos é também apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade antiinflamatória da própolis (NAGAOKA et al., 2003). Entretanto, outros estudos indicam um aumento na produção de H_2O_2 e NO por estas células (ORSI et al., 2000). Um incremento na mobilidade e espraiamento destas células também foram constatados por Tatefugi e colaboradores (1996).

2.3.1.3 Atividade Antineoplásica

A procura de novas drogas para o controle dos diversos tipos de neoplasias tem levado diversos pesquisadores a isolar compostos contidos em amostras de própolis de diversas procedências (BANSKOTA et al., 2001).

Diversos compostos isolados da própolis apresentaram atividade inibitória no crescimento de diversos tumores. Matsuno (1995) constatou a atividade inibitória de um diterpeno, PMS-1, sobre hepatocarcinoma humano. Mitamura et al. (1996), estudando o efeito do PMS-1 sobre o tumor de pele sugeriu que essa atividade esteja relacionada com a inibição na síntese de DNA destas células.

O CAPE isolado de própolis, apresentou atividades antiproliferativas sobre a linhagem de hepatocarcinoma Hep3B, mas mostrou-se inócuo quando adicionado a culturas primárias de hepatócito de camundongo (JIN et al., 2005).

Outro composto, a crisina, também isolada de própolis, mostrou-se efetiva em inibir o crescimento de culturas de linhagem de glioma C6 de rato; as células mantiveram-se estacionárias na fase G1 do ciclo celular (WENG et al., 2005).

Diversos outros compostos com atividade inibitória sobre o crescimento de tumores foram isolados em outros estudos (TAKAI et al., 1996; WEYANT et al., 2000). Orsolic e colaboradores (2005) isolaram compostos hidrossolúveis da própolis que, atuando sinergisticamente, potencializaram a atividade de drogas tumorícidas, inibindo assim o desenvolvimento de tumores acéticos de Ehrlich.

2.3.1.4 Atividade Antibacteriana

Como citado anteriormente, a própolis exerce várias atividades no organismo, dentre elas pode-se destacar a antimicrobiana, atuando sobre vários microrganismos. O comportamento do microrganismo frente à ação antimicrobiana da própolis tem sido investigado, mas a literatura é escassa a respeito dos seus efeitos sobre a resposta imune e variáveis bioquímicas, bem como sobre a sazonalidade de produção na atividade deste apiterápico (SFORCIN, 1999).

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

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

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

De acordo com Bankova e colaboradores (1982), a atividade antimicrobiana da própolis deve-se aos flavonóides pinocembrina e galangina. Esta ação também é atribuída ao ácido benzóico e ferúlico (DONADIEU, 1980).

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

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

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

Chmielewska e colaboradores (1991), classificando 129 amostras de própolis em três categorias diferentes quanto ao nível de atividade bactericida frente a uma amostra de *Bacillus subtilis*, observaram que a própolis foi considerada como de alta atividade quando destruía todas as bactérias em meio de cultura numa concentração de 60-200mg/mL, média atividade em torno de 200 - 600mg/mL e de baixa atividade quando era requerida concentração maior que 600mg/mL.

Em um mesmo apiário, a própolis coletada numa mesma época do ano, de colônias distintas, pode mostrar diferentes atividades. A comparação da atividade e o tamanho da colônia produtora mostrou que tanto as colônias grandes quanto as pequenas podem produzir própolis de alta ou baixa atividade, não havendo então uma relação entre estes dois fatores. Também não foi observada relação entre a propriedade antibacteriana da própolis e nível de impureza. A atividade de

uma própolis produzida por uma mesma colônia mantém-se estável por toda estação de produção (primavera, verão e outono). As amostras que possuíam alta atividade tanto foram encontradas em colônias de alta produção de própolis quanto nas de baixa produção, embora em menor frequência. Vários extratos alcoólicos de própolis foram testados contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Os resultados variaram com o método de extração, porém foram independentes da concentração de álcool utilizada (OBREGON e ROJAS, 1990).

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

Segundo Mirzoeva e colaboradores (1997), as culturas de *Bacillus subtilis* de 6 horas de incubação mostraram ser mais sensíveis do que aquelas de 18 horas "overnight", em estufa. As concentrações de própolis que inibiram 50% das 30 culturas de *B. subtilis* e *E. coli* foram, respectivamente, 200mg/mL e 450mg/mL. Em concentrações menores que 200mg/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 50mg/mL e 100mg/mL, quando comparado ao período lag de células não tratadas.

A própolis parece possuir maior efeito bactericida que bacteriostático, pois a adição de 100mg/mL de própolis em suspensões de *B. subtilis* destruiu as células rapidamente. Após 15 minutos de incubação não foram observadas células viáveis. Assim, o prolongado período Lag nas curvas de crescimento na presença de concentrações baixas de própolis pode ser explicado pelo efeito bactericida sobre a maioria das células, e conseqüente crescimento das células remanescentes (MIRZOEVA et al.1997). Os autores ainda sugeriram que a retomada do crescimento bacteriano sob concentrações baixas de própolis pode também ser explicada por mecanismos como detoxificação latente, seleção de formas resistentes ou detoxificação espontânea dos componentes ativos da própolis.

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

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

Segundo Barizon e colaboradores (1999), a própolis em solução alcoólica exerceu alta atividade contra bactérias Gram positivas e considerável ação contra Gram negativas e fungos em forma de leveduras. O mel enriquecido com própolis teve sua atividade potencializada contra bactérias Gram positivas.

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

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

Pereira (1999) utilizou para determinar a atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima os extratos alcoólicos de própolis verde produzidos pela *Apis mellifera* e coletados de apiários de cerrado do Estado de Minas Gerais. Foram testadas cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas tais como *Listeria monocitogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Shigella flexneri sorovar 1*, isolados de seres humanos. Não foi mostrada nenhuma atividade antibacteriana da própolis contra cepas Gram negativas, mas foi observada contra todas as Gram positivas.

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

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

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

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

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

Meresta e Meresta (1985) examinaram a sensibilidade de 75 cepas bacterianas ao extrato de própolis. Dessas, 69 foram identificadas como *Staphylococcus* spp ou *Streptococcus* spp. Todas as cepas exibiram uma elevada sensibilidade para este apiterápico. Com relação à atividade da própolis sobre *Actinobacillus actinomycetencomitans*, todas as amostras foram consideradas susceptíveis, independentes da origem do extrato alcoólico da própolis utilizado e da época de coleta (SANTOS et al., 1999).

REFERÊNCIAS

AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tóquio, v.58, p.945-946, 1994.

AGUIAR, C.L. Flavonóides e suas atividades biológicas. **Mural da Ciência**. Disponível em: <<http://www.unopar.br/artigos/ArtArtigos000?art-cd=0000000471>> Acessado em: 09 de julho de 2005.

ALCARÃS, L.E. et al. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino Americana**, [S.I.] n. 219, p. 44-47, 1997.

ANDRADE, P.V.D. et al. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n.3, 2001.

ANUÁRIO Milkbizz. 1999/2000. São Paulo, 1999. 326p.

ASSOCIAÇÃO DE SAÚDE PÚBLICA AMERICANA. **Control of communicable diseases manual**., 16 th ed.[S.I.]: Abram S. Benenson, 1995, p. 184-187.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins (review). **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 61, p. 1-10, 2000.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.242, p.135-143, 1982.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.100, n.1/2, p.114-117, 2005.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K. Hepatoprotective and anti-helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian própolis. **Pytomedicine**, Jena, v.8, p.16-23, 2001.

BARIZON, E. et al. Determinação da atividade antimicrobiana da própolis em solução alcóolica, mel e mel com própolis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS, 1., 1999, Franca. **Anais...** Franca: editora, 1999, n.7, p.51, 1999.

BAUTISTA, L. et al., A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 59, n. 2, p. 566-569, 1988.

BEDIDI-MADANI, N.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats` milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 59, p.139-145, 1998.

BERGEY'S. **Manual of determinative bacteriology**. 9 ed Baltimore: M.D. Williams & S.T. Wilkins, 1994. 787p.

BONVEHI, J.S.; COLL, F.F.; JORDÁ, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.71, n.5, p.529-532, 1994.

BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of própolis extract. **Fitoterapia**, Milano, v.73, p. 853-863,2002.

BRITO, J.R.F. et al. Sensibilidade e especificidade "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.17, n.2, p.49 – 53, 1997.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente.** Juiz de Fora, Embrapa CNPGL 1998. 25 p.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. **Microbios**, Cambridge, n.62, p.19-22, 1990.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

CASOLI L. D. Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru. **Piracicaba:** editora, 2005 46p.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Própolis, na old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v. 73 n. 1. p. 51-56, 2002. Supplement.

CASTRO, M.V.; LANGENEGGER, M.C.E.H.; LANGENEGGER, J. Ocorrência e caracterização de estafilococos coagulase negativos em leite de cabras no estado do Rio de Janeiro. **Semina**, Londrina, v.13, p.15-17,1992.

CHABEAUDIE, N. et al. Lymphocyte subsets in the mammary gland of sows. **Research in Veterinary Science**, London, v. 55, p. 351 – 355, 1993.

CHMIELEWSKA, H.R.; MUSZYNSKA, J.; KONOPACKA, Z. Antibacterial activity of propolis as affected by the conditions of its collection. **Pszczelnicze Zeszyty Nauhowe**, v.35, p.47-53, 1991.

CIZMARIK, J.; MACICKA, M.; MATEL, I. Analisis y critica de las teorías acerca de la formación del Propoleos. In: Propoleos – **investigaciones científicas y**

opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos, Apimondia: editora Bucarest, 1975. 175p.

CONTRERAS, A. et al. Prevalence and etiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Rumin Research**, Amsterdam v.17, p. 71-78, 1995.

CONTRERAS A.; PAAP, M.J.; MILLER, R.H. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. **Small Ruminant Research**, Amsterdam v.31, p. 203-208, 1999.

CONTRERAS A. et al. Significance of pathogens in goat mastitis. In: 7th **INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS**, Tours. Anais... Tours editora, 2000. p. 753-754.

CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Medsi. 1992. 843p.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S; GÓRNIAC, S.L, BERNADI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.422 – 434.

CREMOUX, R.; MENARD, J.L. Influence des infections mammaires sur la quantité de lait et les taux. **Reussir - La Chevre**, França, n. 213, p. 32 - 34, 1996.

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

EMBRAPA – **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. O leite de Cabra (a) Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/leite>> Acesso em 29 de janeiro de 2007.

EMBRAPA – **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa (b) Disponível em: <http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa020819a.htm > Acesso em 29 de janeiro de 2007.

FDA/CFSAN (2003). **Bad Bug Book**. *Sstaphylococcus aureus*. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html> > Acesso em 29 de janeiro de 2007.

GARCIA-VIGUEIRA, C., GREENAWAY, W., WHATLEY, F.R., Composition of propolis from two different Spanish regions. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v. 47c, p.634 - 637,1992.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v.422, p.115-124, 2004.

GHISALBERTI, E.L. Própolis: A Review. **Bee World**, Bucks, v. 60, p. 59-84, 1979.

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**. 1995.18f. Monografia. Especialização em... Escola de Medicina Veterinária – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

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

GUS, S.B.; ACE, D.L. Mastitis. In: Goat Handbook. USA: National Agricultural Library, 1992. Disponível em: <<http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/goat>>. Acesso em 01 de julho de 2006.

HASAN, T. et al. Patch test reactions to cosmetic allergens in 1995-1997 and 2000-2002 in Finland – a multicentre study. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v.53, n.1, p.40-45, 2005.

HOFFMANN, F.L. et al. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de três produtos farmacêuticos à base de própolis. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.53, p.57-60, 1998.

HOMAN, E.J.; WATTIAUX, M.A. **Technical dairy guide**: lactation and milking. 2.ed. Wisconsin, USA: The Babcock Institute for International Dairy, 1996. p. 57 – 70,

JIN, U.H. et al. Caffeic acid phenylester in propolis a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.360, n.1\2, p.132-140, 2005.

KEDZIA, B.; HOLDERNA, E. Investigations on the combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus*. **Herba-Polonica**, Poznan v.32, n.3/4, p.187-195, 1986.

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987. 612p.

KOO, H. et al. Avaliação do potencial anti-cárie e anti-placa da própolis de *Apis mellifera* da região sudeste e sul do Brasil. I- Atividade antimicrobiana *in vitro* sobre patógenos bucais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS, 1. 1999, Franca Anais... Franca: editora, 1999. v.7, p.48.

KORHONEN, H., KAARTINEN, L. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: SANDHOLM, M. et al. The bovine udder and mastitis. Helsinki, University of Helsinki, p.76-82.

KROL, W. et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel Forschung**, Aulendorf, v.43, n.5, p.607-609, 1993.

KROL, W.; SCHELLER, S.; CZUBA, Z. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and phenolic components. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.55,p.19-25,1996.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharmazie**,[S.l.] v.48, n.10, p.785-786, 1993.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v.64, n.3, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, London, v.84, n.3, p.329-339, 2004.

LANGONI, H. et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* da propolis. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994, Rio Cuarto, Argentina, **Anais...** Rio Cuarto: Editora, 1994. p. 189- 192.

LARSEN, H.D. et al. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. **Veterinary Microbiology** . Amsterdam, v.71, n.1-2, p.89-101, 2000.

LEVY, N.C. Atividade antimicrobiana da propolis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS, 1. 1999, Franca. **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.18, 1999.

LIMA JUNIOR, A.D.; NADER FILHO, A.; VIANNI, M.C.E. Susceptibilidade “in vitro” dos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativos, isolados em casos de mastite caprina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.45, p. 291-296,1993.

LU, Y.; WU, C.;YUAN, Z. Determination of heperetin, cinnamicacidandnicotinicacid mpropolis whith micellar electrokinetic capillary chromatography. **Fitoterapia**, Milano, v.75, n.3/4, p.267-276, 2004.

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. et al. Estudio químico e biológico de própolis brasileiras. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994, Córdoba. Argentina, **Anais**.... Córdoba: editora, 1994. p.193-196.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Versalles, v.26, n.2, p. 83-99, 1995.

MARQUELE, F.D. et al. Assesment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of própolis alone and in tropical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.39, n.3\4, p.455-462,2005.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeischrift fur Natuforschung**, Tübingen, v.50c, p.93-97,1995.

MATTOS, L.M.; MAIA, A.B.R.A.; NELSON, D.L. Dosagem de quercetina em própolis. **Revista da Universidade de Franca**, Franca, v.7, n.7, p.34-35, 1999.

MENDES, E. S. et al. Características físicas, químicas e microbiológicas do leite de cabra pasteurizado e comercializado no município de Recife. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: editora, 1995.

MENZIES, P.I.; RAMANOON, S.Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of the North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, p. 333-358, 2001.

MERESTA, L.; MERESTA, T. Sensitivity of bovine mastitis bacteria to propolis in vitro. **Medycyna Weterynaryjna**, Warszawa, v. 41, n.8, p.489-492, 1985.

MIROLYUBOV, M.G.; BARSKOV, A.A. Propolis for bovine mastitis. **Veterinary**, n.2, p.45-46, 1980.

MIRZOEVA, O.K.; CALDER, P.C. The effect of propolis and its components on elconanold production during inflammatory response. **Prostaglandins Leucotriens and Essential fatty Acids**, v.55,p.441-449, 1996.

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.

MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from própolis on chemically induced skin tumours in mice. **Anticancer Research**, v.16, p.2669-2672, 1996.

MORENO, M.I.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.71,p.109-114, 2000.

MOTA, R. A. Mastite caprina: prevalência de agentes infecciosos envolvidos no estado de Pernambuco e indicações terapêuticas. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1999, Recife. **Anais...** Recife: editora, 1999. p. 129-132, 1999.

MURICY, R.F. **Ocorrência de mamite subclínica em caprinos e qualidade higiênicosanitária do leite produzido em propriedades associadas à Coopertativa Languiru, Teutônia - RS.** 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NAGAOKA, T. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v.26, n.4, p.487-491,2003.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis.** 4th ed. Madison: The National Mastitis Council Press, 1998. 64p.

NICOLETTI, P. Goat disease and human health. In: INTERNATIONAL CONFERENCES ON GOATS, 4., 1987, Brasilia, DF. **Proceedings...** Brasília, DF: EMBRAPA, 1987. v. 1, p. 491 – 511.

OBREGON, A.M.; ROJAS, N. Antimicrobial action of alcoholic extracts of propolis. **Revista Cubana de Farmacia**, La Habana, v.24, n.1, p.34-44, 1990.

ORSI, R.O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.6,p.205-219, 2000.

ORSI, R.O. et al. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against salmonella Typhimurium. **International Journal of Immunopharmacology**, Elmsford, v.5, p.359-368, 2005.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v.28, n.4, p.694-700, 2005.

PARK, Y. K. et al. Informação Técnica. **OESP – Alimentação** n° 27 , 1999.

PARK, J.H. et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl esters in Balb/c mice. **International Journal of Immunopharmacology**, Elmsford v.4, n.3, p 429-436, 2004.

PAULINO, N. Reação de hipersensibilidade à própolis. **Revista da Universidade de Franca**, Franca, n.7, p.16, 1999.

PEREIRA, M.L. Atividade antibacteriana. **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.20, 1999.

PERRIN, G. G. et al. Relationships between California Mastitis Test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 26, n. 1-2, p. 167-170, 1997.

PINHEIRO, R. R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p. 534 - 543, 2000.

PINHEIRO, R.R.; ALVES F.S. F.; ANDRIOLI, A. Diagnóstico precoce de doenças e sua importância na produção de caprinos e ovinos. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 6., 2002, local. **Anais...** local: editora, 2002.

PRADO FILHO, L.G.; AZEVEDO, J.L.; FLECHTMANN, C.H. Antimicrobianos em própolis *Apis mellifera* L. **Boletim da Industria Animal**, [S.I.] v.20, p.399-403, 1962.

POPOVA, M. et al. Antibacterial activity of Turkish própolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**, Jena, v.12, n.3, p.221-228, 2005.

POUTREL, B. et al. Control of intramammary infections in goats: impact on somatic cell count, **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75,566-570, 1997.

PYÖRÄLÄ, S.H.K.; PYÖRÄLÄ, E.O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989 – 1995). **Javma**, Schaumburg, v.212, n.3, p.407 – 412, 1998.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology** local: Wolfe, 1994. 648p.

RADOSTITS, O.M.; LESLIE, K.E.; FETROW, J. **Herd health: food animal production medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders , 1994. 631p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica veterinária**. 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p.

RIBEIRO, M.G. et al. Mastite caprina: Estudo microbiológico, físico-químico e do diagnóstico através de provas indiretas. **Biológico**, São Paulo, v.61, n.2, p. 27-33, 1999.

SALMON, H. The intestinal and mammary immune system in pigs. **Veterinary Immunology of Immunopathology**, Amsterdam, v. 17, p. 367 – 388, 1987.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research** , Abingdon, v.19, n.2, p. 183-188, 2005.

SANTOS, C.R. et al. Controle de qualidade físico-químico e biológico de tinturas de própolis. **Revista da Universidade de Franca**, Franca, n.7, p.35, 1999.

SANTOS, F.A. et al. Antibacterial activity of Brazilian própolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne v. 80, p. 1-7, 2002.

SCHOLLENBERGER, A., DEGORSKI, A., FRYMUS, T. Cells of sow mammary secretions I morphology and differential counts during lactation. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.33, p.31 – 38, 1986.

SFORCIN, J.M. Efeito imunoprotetor da própolis. **Revista da Universidade de Franca**, Franca, v.7, n.7, p.17, 1999.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.98, n.3, p.301-305, 2005.

SCHULZ, J. Somatic cells in goat milk. **Tierärztliche Praxis**, Stuttgart, v. 22, n. 5, p. 438 - 442, 1994.

SILVA, E.R. et al. Contagem de células somáticas e california mastitis test no diagnóstico da mamite caprina subclínica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Brasília, DF, v. 18, n. 2, p. 78 - 83, 1996.

SILVA, W.P. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitis milk and environmental samples of Brazilian

dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.31, p.103 – 106, 2000.

SILVA, E.R. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of Staphylococcus species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 55, n. 1-3, p. 45-49, 2004.

SOARES, J.D.M. et al. Triterpenos isolados de própolis piauiense. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas [s.n.], 2000, v.2

SOUSA, M.L.; BASTOS, J.K.I. Isolamento de alguns componentes da própolis. **Revista da Universidade de Franca**, Franca v.7, n.7, p.40, 1999.

STANFORD, T.L.M. et al. Enterotoxigenicity of Staphylococcus spp. isolated of milk in natura, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v.26 n.1 ene./mar. 2006.

SUN, F.; HAYAMI, S.; HARUNA, S. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, [S.I.] v.48,p.1462-1465, 2000.

TAKAI, H.; YAMAMOTO, H.; SUZUKI, I. The effect against antitumor and recovery of leukopenia by combined use of water soluble própolis and antitumor drug (5-FU). **Igaku to Seibutsugaku**, v.132, p.311-316, 1996.

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

TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v.19, p.966-970, 1996.

TOMÁS-BARBERANFÁN, F.A. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 34, p.191-196, 1993.

VARGAS, A.C. et al. Dados parciais do teste in vitro da atividade antibacteriana da propolis. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, 1.; CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 12., 1994, Porto Alegre **Anais....** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. 160p.

VANDAMME, E.J. Antibiotic search and production in overview In: Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences: A series of textbooks and monographs. v.22, p.3-31, New York: **Marcel Dekker**, 1984.

WAAGE, S.; MORK, T.; ROROS, A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.4, p.712 – 719, 1999.

WENG, M.S.; HO, Y.S.; LIN, J.K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1\Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.69, n.12, p.1815-1827, 2005.

WEYANT, M.J. et al. Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.6, p.949-956, 2000.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana da própolis verde frente à *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar clinicamente os animais quanto à presença ou não de mastites
- Isolar e identificar os microrganismos encontrados no leite dos animais avaliados
- Determinar a susceptibilidade dos isolados frente a diferentes antibióticos utilizados no tratamento de mastites
- Avaliar a atividade antimicrobiana da própolis verde *in vitro*
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da própolis verde
- Avaliar o efeito bactericida e bacteriostático da própolis verde.

CAPÍTULO 1

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE
STAPHYLOCOCCUS SPP ISOLADOS DE LEITE DE CABRAS COM MASTITE
EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE
STAPHYLOCOCCUS SPP ISOLADOS DE LEITE DE CABRAS COM MASTITE
EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

PROFILE OF ANTIMICROBIAN SUCEPTIBILITIE *IN VITRO* OF
STAPHYLOCOCCUS SPP ISOLATED OF MILK OF GOATS WITH MASTITIS IN
DISTRICTS OF THE STATE OF PERNAMBUCO

RESUMO

A mastite é o processo inflamatório de origem infecciosa ou não, que atinge as diferentes estruturas da glândula mamária. Caracteriza-se por alterações físico-químicas e bacteriológicas do leite, e lesões irreparáveis no tecido mamário. Em cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grave problema, tanto por aumentar os custos da produção quanto pelos riscos à saúde pública. Com o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp isoladas do leite de cabras com mastite clínica e subclínica, foi coletado o leite de cabras procedentes de 19 propriedades de diferentes municípios do estado de Pernambuco. Amostras do leite foram colhidas para isolamento dos microrganismos envolvidos em ágar base enriquecido com 8% de sangue desfibrinado de carneiro. Provas bioquímicas foram utilizadas na identificação das amostras. Foram isoladas 45 amostras de *Staphylococcus* spp das quais 26,66% foram coagulase positiva (SCP) e 73,33% coagulase negativa (SCN). Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela técnica de difusão em discos, utilizando ágar Müller Hinton, onde o inóculo bacteriano foi obtido conforme preconiza o National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS. Os isolados foram testados frente a 13 antibióticos: cefalotina, gentamicina, penicilina G, sulfazotrim, tetraciclina, neomicina,

nitrofurantoína, ampicilina, amoxicilina, estreptomicina, canamicina, lincomicina e cloranfenicol. Os resultados obtidos demonstram que 95,56% dos isolados foram sensíveis a cefalotina e a tetraciclina. Observou-se resistência múltipla para 64,44% das amostras estudadas, dentre estas apenas 27,27% foram resistentes exclusivamente a estreptomicina. O uso da estreptomicina em outras enfermidades sem a devida prescrição veterinária, pode explicar os dados de resistência encontrados entre os isolados, alertando aos criadores sobre a importância da realização do diagnóstico bacteriológico e antibiograma para recomendar a terapia mais adequada para cada rebanho.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus* spp , antibiograma, mastite, cabra

ABSTRACT

The mastitis is the inflammatory process of infectious origin or not, that reaches the different structures of the mammary gland. It is characterized by alterations physical-chemistries and bacteriological of the milk and irreparable lesions in the mammary fabric. In goats explored for the production of milk, the mastitis is a serious problem, so much for increasing the costs of the production as for the risks to the public health. With the objective of evaluating the profile of antimicrobial sensibility in vitro of *Staphylococcus* spp isolated of the milk of goats with clinical mastitis and subclinical, the milk of goats coming from 19 farms districts of the state of Pernambuco was collected. Samples of the milk were picked for isolation of the microorganisms involved in ágar base enriched with 8% of blood sheep desfibrinado. Proofs biochemistries were used in the identification of the samples. They were isolated 45 samples of *Staphylococcus* spp of the which 26.66% were positive coagulase (SCP) and 73.33% negative coagulase (SCN). The sensibility tests to the antimicrobians were accomplished by the diffusion technique in disks,

using ágar Müller Hinton, where the bacterial inoculus was obtained as it extols National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS. The isolated ones were tested front to 13 antibiotics: cefalotyne, gentamicyne, penicillyne G, sulfazotrim, tetracicylyne, neomicyne, nitrofurantoyne, ampicilyne, amoxicilyne, estreptomicyne, kanamicyne, lincomicyne and cloranfenicol. The obtained results demonstrate that 95.56% of the isolated ones were sensitive the cefalotyne and the tetracicylyne. Multiple resistance was observed for 64.44% of the studied samples, among these 27.27% were only exclusively resistant the estreptomicyne. The use of estreptomicyne in other illnesses without the due veterinary prescription, it can explain the resistance data found among the isolated ones, alerting the creators on the importance of the accomplishment of the bacteriological diagnosis and antibiogram to recommend the most appropriate therapy for each flock.

Key-words: *Staphylococcus* spp, antibiogram, mastitis, goat

INTRODUÇÃO

O leite é um excelente meio para crescimento e suporte de agentes potencialmente patogênicos ao homem, os quais podem ser originários de contaminação pós-ordenha ou de infecções do úbere do animal (NICOLETTI, 1987).

Mota e colaboradores (2000) definem mastite como sendo a inflamação total ou parcial da glândula mamária causada pela presença de um ou mais microrganismos patogênicos, podendo apresentar-se nas formas subclínica ou clínica. No Brasil, a prevalência da mastite em caprinos tem variado entre 22 e 75% do rebanho. Na região Nordeste, sinais clínicos de mastite em cabras foram relatados em 51,2% dos rebanhos (PINHEIRO et al., 2000); enquanto que no Rio Grande do Sul 30,8% de metades mamárias caprinas avaliadas foram positivas para mastite subclínica (MURICY, 2003).

A mastite sub-clínica só é detectada por meio de análise do leite (LUQUET, 1985) e tem grande impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros (PHILPOT e NICKERSON, 1991), podendo reduzir em 5 a 20% a produção de leite (CREMOUX e MENARD, 1996). Nos caprinos, podem ser identificadas pelo "California Mastitis Test" (CMT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e análise microbiológica de amostras de leite (GUS e ACE, 2007).

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns em todas as formas de mastite caprina, apresentando uma prevalência que varia de 5,6-17,0% (WHITE e HINCKLEY, 1999). Dados relatados por Silva e colaboradores (2004) demonstraram que em mastites caprinas subclínicas este percentual é de 37%.

As peculiaridades do seu habitat tornam a sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmitido aos alimentos por manipuladores (IARIA, 1980; CREMOUX e MENARD, 1996), na maioria dos casos por portadores e também por animais, principalmente, gado leiteiro com mastites, apresentando altas contagens do microrganismo no leite (MACHOSHVILI et al., 1991). O tratamento antibiótico é uma das alternativas recomendadas para de reduzir a

infecção intramamária e , conseqüentemente, a prevalência da mastite no rebanho (BRITO e BRITO, 1998). O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos para o tratamento da mastite ou de qualquer outra infecção pode gerar, entretanto um aumento do nível de resistência de muitos microrganismos a estas drogas (CONTRERAS et al., 1995). Assim, o conhecimento dos agentes bacterianos responsáveis, bem como o perfil de susceptibilidade do microrganismo às drogas deve melhorar as taxas de cura e reduzir a resistência bacteriana (SILVA et al., 2004).

Objetivou-se com este estudo avaliar a freqüência de *Staphylococcus* spp em mastites clínicas e subclínicas e a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* destes isolados de caprinos procedentes de propriedades de oito municípios do Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 90 cabras em lactação, de raças puras e mestiças, em diferentes fases de lactação, primíparas e múltiparas oriundas de 19 propriedades localizadas nos Municípios de Arcoverde, Brejo da Madre de Deus, Garanhuns, Jaboatão dos Guararapes, Paudalho, Olinda, Pedra e São Lourenço no Estado de Pernambuco. Os animais foram examinados de acordo com a técnica preconizada por Dirksen e colaboradores (1993). Os animais foram submetidos ao teste da caneca telada para o diagnóstico da mastite clínica e ao California Mastitis Test para o diagnóstico da mastite subclínica. Os animais positivos a um dos testes de diagnóstico tiveram seus úberes lavados e desinfetados para a colheita das amostras de leite para a realização do exame microbiológico. O leite foi mantido sob refrigeração em caixa isotérmica até o transporte ao laboratório para posterior processamento.

Para o isolamento bacteriano, 0,1 mL do leite foi semeado em placas de Petri, contendo ágar base acrescido de 8% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas em estufa bacteriológica (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1969). Observou-se a presença

de hemólise em ágar sangue, além das características microscópicas de cada colônia isolada foram analisadas pelo método de Gram. Realizou-se, ainda, os testes de catalase em lâmina (QUINN et al., 1994) e coagulase em tubo (SILVA et al., 1997). Após identificação, as colônias de *Staphylococcus* spp foram repicadas para o caldo Brain Heart Infusion (BHI) e estocadas em criotubos contendo glicerol na proporção de 1:1 (v/v) e mantidas a -20°C para posterior realização dos antibiogramas.

As amostras foram reativadas transferindo-se 0,25 mL da cultura estoque para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth), agitadas e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas. Após esse período foram semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Müller Hinton e incubadas por 24 horas a 37°C e imediatamente utilizadas para os testes de resistência antimicrobiana.

Para avaliação do perfil de sensibilidade e resistência dos isolados frente aos diferentes antibióticos (cefalotina - $30\mu\text{g}$, gentamicina - $10\mu\text{g}$, penicilina G - 10UI, sulfazotrim - $25\mu\text{g}$, tetraciclina - $30\mu\text{g}$, neomicina - $30\mu\text{g}$, nitrofurantoína - $300\mu\text{g}$, ampicilina - $10\mu\text{g}$, amoxicilina - $10\mu\text{g}$, estreptomicina - $10\mu\text{g}$, canamicina $30\mu\text{g}$, lincomicina - $2\mu\text{g}$ e clorafenicol - $30\mu\text{g}$), utilizou-se o teste de difusão em disco (National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2003). As amostras foram cultivadas em Erlenmeyer contendo 50 mL do meio de cultura TSB e foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. O inóculo foi incorporado ao ágar Müller Hinton e padronizado para uma absorbância inicial de 0,1 a 600nm no volume final das placas de Petri. Após solidificação do meio de cultura foram colocados dois discos dos antibióticos previamente selecionados por placa e incubados a 37°C por 48 horas. A leitura foi realizada pela medida do diâmetro dos halos (mm) com o auxílio de um paquímetro, sendo os ensaios realizados em duplicata.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico *Statistica 6.0* da StatSoft, Inc. utilizando o teste t de student para a verificação da correlação entre os halos de sensibilidade apresentados pelas amostras dos isolados de *Staphylococcus* spp.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 180 metades mamárias estudadas, apenas 123 apresentaram mastite, entre as quais, em apenas 2,44% foram detectados sinais de mastite clínica. Contreras e colaboradores (2007) em uma revisão sobre mastite em pequenos ruminantes, relataram que a incidência anual de mastite clínica em pequenos ruminantes é geralmente menor que 5%, dados que corroboram com os encontrados neste trabalho.

Das 123 amostras de leite de animais com mastite subclínica, 45,84% apresentaram duas cruzes (++) e destas apenas 6,7% foram confirmadas por análises microbiológicas, enquanto que 54,16% apresentaram três cruzes e apenas 4,2% não foram confirmadas por análises microbiológicas.

Resultado semelhante foi obtido no Quênia onde não foi observada boa correlação entre CMT e bacteriológico (NDEGWA et al., 2000). De acordo com Winter e Baumgartner (1999), o CMT não é um teste específico para as metades mamárias que estejam infectadas, devendo outros testes de diagnósticos serem utilizados para o controle eficaz da saúde do úbere caprino, estando em conformidade com os resultados obtidos neste trabalho.

Das 120 amostras de leite investigadas, foram isoladas 68 bactérias das quais 45 foram identificadas como *Staphylococcus* spp. Das amostras de *Staphylococcus* spp, 26,66% isolados foram coagulase positivos (SCP) e 73,34% coagulase negativa (SCN). Esses achados estão de acordo com os obtidos por Contreras e colaboradores (1999) e Silva e colaboradores (2004) que encontraram cerca de 60% de SCN em cabras com mastite clínica no município de Sobral (CE) e Bochev e Russenova (2005) que encontraram no sudeste da Bulgária índices de SCN de 80,2% e SCP 19,8%, discordando daqueles encontrados por Santos e colaboradores (2007) que obtiveram 29% de SCN em três capris na região da Grande Porto Alegre – RS.

De acordo com Contreras e colaboradores (2007), as espécies do gênero *Staphylococcus* são os principais agentes envolvidos em todas as formas de

mastite em cabras, confirmando os resultados aqui obtidos.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados referentes ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as amostras analisadas.

Os resultados mostraram que das amostras de *Staphylococcus* spp, 95,56% dos isolados foram sensíveis a cefalotina (30µg) e tetraciclina (30µg), enquanto que 93,33 % foram para a penicilina G (10UI). Verifica-se que os maiores valores foram obtidos para classe de antibióticos β-lactâmicos e macrolídeos. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por Bochev e Russenova (2005) que relataram 100% de sensibilidade a tetraciclina em mastites em cabras do Sudeste da Bulgária.

Se considerar o padrão de intermediários somado ao de resistentes, nota-se um considerável índice de resistência (73,33 %) frente à estreptomicina (classe dos aminoglicosídeos). Estes dados sugerem que o uso indiscriminado deste medicamento em caprinos, indicado não só no tratamento de mastite, mas também como coadjuvante em outras enfermidades, podem induzir a resistência nos rebanhos estudados.

Clavijo e colaboradores (2002) investigando o rebanho caprino na Venezuela relataram que todos os isolados (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter aerogenes* e *Mycoplasma* sp.), apresentaram alta resistência aos antibióticos testados, com frequência que variou de 4,7 a 9,5%, o que é característico para propriedades onde se aplicam tratamentos antibacterianos sem o diagnóstico preciso por falta de supervisão veterinária. Relataram, ainda, 100% de sensibilidade para amicacina, clorafenicol, danofloxacina, oxacilina, novobiocina, tetraciclina e enrofloxacina, o que corroboram com os resultados encontrados nesta pesquisa, uma vez que foram encontrados índices de 100% de sensibilidade dos isolados de SCN à cefalotina e nitrofurantoína (Tabela 1).

Neste estudo, os isolados de SCN demonstraram maior sensibilidade frente a cefalotina (100%), nitrofurantoína (100%), tetraciclina (96,97%), gentamicina (96,97%), ampicilina (93,94%), sulfazotrim (90,91%), clorafenicol (90,91%),

penicilina G (87,88%), amoxicilina (87,88%), neomicina (81,82%), canamicina (69,70%) e lincomicina (66,67%).

Silva e colaboradores (2004) observaram índices semelhantes aos deste trabalho quanto à sensibilidade dos SCN a tetraciclina (87,5%), oxacilina (77,5%), tetraciclina (87,5%) e eritromicina, trimetoprim/sulfametoxazol e cefalotina (97,5%). Exceto para a penicilina G (40%) que diverge dos dados obtidos nesta investigação os quais apresentaram sensibilidade à penicillina G (87,88%), o que sugere que os rebanhos avaliados possivelmente não foram submetidos a tratamentos sucessivos utilizando esta droga. Estudos realizados por Lima-Junior e colaboradores (1993), também demonstraram índices elevados de resistência à penicillina G em rebanhos caprinos no Nordeste, o que pode ser explicado em função da recomendação dessa droga como principal agente para o tratamento de mastite por *Staphylococcus*.

Tabela 1 - Perfil da sensibilidade antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos de amostras de leite caprino com mastite

Antimicrobianos	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Staphylococcus</i> sp coagulase negativa	<i>Staphylococcus</i> sp coagulase positiva
Beta lactamicos			
Cefalotina 30µg	95,56%	100%	83,33%
Penicilina G 10UI	93,33%	87,88%	58,33%
Ampicilina 10µg	84,44%	93,94%	58,33%
Amoxicilina 10µg	82,22%	87,88%	58,33%
Tetraciclina			
Tetraciclina 30µg	95,56%	96,97%	91,67%
Aminoglicosídeos			
Neomicina 30 µg	82,22%	81,82%	75%
Gentamicina 10µg	80,00%	96,97%	83,33%
Estreptomicina 10µg	28,89%	24,24%	33,33%
Kanamicina 30µg	57,78%	69,70%	25%
Lincosamidas			
Lincomicina 2µg	62,22%	66,67%	50%
Sulfonamidas			
Sulfazotrim 25µg	88,89%	90,91%	83,33%
Outros			
Clorafenicol 30µg	93,33%	90,91%	100%
Nitrofurantoína 300 µg	91,11%	100%	58,33%

Embora o uso indiscriminado dos vários antimicrobianos disponíveis para o tratamento da mastite tenha aumentado a resistência dos microrganismos a estes medicamentos, sobretudo no Brasil, (COSTA, 1999) os dados encontrados neste estudo apresentaram altos índices de sensibilidade e baixos índices de resistência à alguns antibióticos utilizados para o tratamento de mastite caprina, com exceção da resposta frente a estreptomicina (73,33 %).

CONCLUSÃO

Conclui-se que os *Staphylococcus* coagulase negativos são isolados com maior frequência nos casos de mastite subclínica em cabras e que é necessária a realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos para orientar o tratamento e controle desta doença na região estudada.

REFERÊNCIAS

BOCHEV, I. & RUSSENOVA, N. Resistance of *Staphylococcus* SPP. Strains isolated from goats with subclinical mastitis. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 8, n.2, p. 109-118, 2005.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente**. Juiz de Fora, Embrapa CNPGL 25 p. 1998.

CLAVIJO A. M. et al. Efecto del sistema de explotación sobre la aparición de mastitis caprina en dos fincas del estado falcón, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos. **Zootecnia Tropical**, Macary, v.20 n.3 ago. 2002.

CONTRERAS, A. et al. Prevalence and etiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.17, p. 71-78, 1995.

CONTRERAS A.; PAAP,M.J.; MILLER, R.H. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.31, p. 203-208,1999.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research, amsterdam**, v. 68 p.145–153, 2007.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S, GÓRNIAC, S.L, BERNADI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.422 – 434.

CREMOUX, R. & MENARD, J.L. Influence des infections mammaires sur la quantite de lait et lês taux. **Reussir - La Chevre**, Paris, n. 213, p. 32 - 34, 1996.

DIRKSEN, G. et al. **Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. São Paulo: Guanabara, 1993. 420p.

IARIA, S.T.; FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. Pesquisa de Staphylococcus aureus enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 14, p. 93-100, 1980.

GUS, S.B. ; ACE, D.L. Mastitis. In: Goat Handbook. USA: **National Agricultural library**,1992.homepage<<http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/goat>> Acesso em 25 de janeiro de 2007.

LUQUET, F.M. **Do úbere à fábrica de laticínios**. Sintra: Europa-América, 1985. v. 1. 444 p.

MACHOSHVILI, I.A.; PENNA, T.C.V.; COLOMBO, A.J. Resistência térmicas de cepas de Staphylococcus aureus em solução tampão fosfato (pH 7,0) e em leite reconstituído. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 323-329, 1991.

MOTA, R.A. et al. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 19, n. 114, p. 26 – 29, 2000.

MURICY, R.F. **Ocorrência de mamite subclínica em caprinos e qualidade higiênicosanitária do leite produzido em propriedades associadas à Coopertativa Languiru, Teutônia - RS**. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em

Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis**. Washington D. C.: University of New Hampshire Press, 1969. 27p.

NCCLS - NATIONAL COMITÉ CLINICAL LABORATORY STANDARDS Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, **Wayne, Pennsylvania** 19087-1898 USA, 2003.

NDEGWA, E.N.; MULEI, C.M.; MUNYUA, S.J. The prevalence of subclinical mastitis in dairy goats in Kenya. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretória, v. 71, n.1, p. 25 - 27, 2000.

NICOLETTI, P. Goat disease and human health. In: INTERNATIONAL CONFERENCES ON GOATS, 4., 1987, Brasília. **Proceedings...** Brasília DF: EMBRAPA, 1987. v. 1, p. 491 – 511.

PHILPOT, W.N. ; NICKERSON, S.C. **Mastitis: counter attack**. Naperville: Bobson Bros, 1991.150 p

PINHEIRO, R. R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p. 534 - 543, 2000.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology**. 1. ed. Wolfe, 1994. 648p.

SANTOS A. R.; SCHERER S.; SCHMIDT V. Validação da contagem de células somáticas e do California Mastitis Test como método diagnóstico da mastite subclínica em caprinos. local:editora, 2004, disponível em:< http://www.cav.udesc.br/2004_1/mamite.pdf > acesso em 14 de fevereiro de 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.

SILVA, E. R. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.55 p.45 - 49, 2004.

WINTER, P.; BAUMGARTNER, W. Evaluation of the California mastitis test (CMT) reaction in goat milk and interpretation. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 106, n 1, p. 30 - 34, 1999.

WHITE, E.C.; HINCKLEY, L.S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.33, p. 117–121. 1999.

Capítulo 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE
FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS* SPP ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE
FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS* SPP ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA

EVALUATION OF GREEN PROPOLIS ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST
STAPHYLOCOCCUS SPP ISOLATED FROM GOATS' MASTITIS

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade à própolis verde *in vitro* de bactérias isoladas do leite de cabras com mastite clínica e subclínica, foram estudados 262 animais procedentes de diferentes propriedades de 08 municípios do estado de Pernambuco. Amostras do leite dos animais com mastite foram colhidas para isolamento dos microrganismos envolvidos em agar base enriquecido com 8% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro. Provas bioquímicas foram utilizadas na identificação das amostras. Os testes de sensibilidade às frações de própolis foram realizados pela técnica de difusão em discos utilizando ágar Müller Hinton, na qual o inóculo bacteriano é obtido conforme preconiza o NCCLS (National Comité Clinical Laboratory Standards). As frações etanólicas e aquosas dos extratos de própolis verde foram cedidas pela Néctar-Farmacêutica[®]. Foi utilizado o método de diluição para determinação da concentração inibitória mínima – CIM e os efeitos bactericida e bacteriostático. Foram isoladas 45 amostras de *Staphylococcus* spp das quais 26,66% foram coagulase positiva (SCP) e 73,33% coagulase negativa (SCN), que apresentaram sensibilidade para frações aquosa e etanólica com valores dos halos de inibição que variaram de 6-25mm, e quando comparados entre si observou-se diferença significativa entre os valores dos halos ($p < 0,01$). A concentração inibitória mínima foi de 100 mg/mL para as frações alcoólica e etanólica quando utilizou-se uma amostra *Staphylococcus* sp coagulase positivo e duas *Staphylococcus* sp coagulase negativo, apresentando efeito bactericida em todas as concentrações testadas. A partir dos resultados obtidos *in vitro*, a própolis verde apresentou-se como

uma alternativa para o tratamento de mastite caprina, devido às características de sensibilidade e efeito bactericida frente aos isolados de mastite caprina analisados.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; leite de cabra; mastite; propolis; *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

With the objective of evaluating the sensibility profile to the propolis green *in vitro* of isolated bacterian of the milk of goats with clinical mastitis and subclinical, 262 animals coming from different properties of eight districts of the state of Pernambuco were studied. Samples of the milk of the animals with mastitis were picked for isolation of the microrganisms involved in agar base enriched with 8% (v/v) of blood sheep desfibrinated. Proofs biochemistries were used in the identification of the samples. The sensibility tests to the propolis fractions were accomplished by the diffusion technique in disks using Müller Hinton agar, in which the bacterial inóculo is obtained as it extols NCCLS (National Comite Clinical Laboratory Standards). The fractions etanoils and aqueous of the extracts of green propolis they were given up by the Nectar-Farmacêutica®. The dilution method was used for determination of the concentration minimum inibitorie - CIM and the effects bactericide and bacteriosthatic. They were isolated 45 samples of *Staphylococcus* spp of the which 26.66% were positive coagulase (SCP) and 73.33% negative coagulase (SCN), that they presented sensibility for aqueous fractions and etanólica with values of the inhibition halos that varied of 6-25mm, and when compared to each other it was observed it differentiates significant among the values of the halos ($p < 0.01$). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) went of 100 mg/mL to the alcoholic fractions and etanolic when a sample was used *Staphylococcus* sp positive coagulase and two *Staphylococcus* sp negative coagulase, presenting bactericidal effect in all the tested concentrations. Starting from the results obtained *in vitro*, the green propolis came as an alternative for the treatment of goat mastitis, due to the sensibility characteristics and effect bactericidal front to the isolated of goat mastitis analyzed.

Word-key: antimicrobial activity; goat milk; mastitis; propolis; *Staphylococcus* spp.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um excelente meio para crescimento e suporte de agentes potencialmente patogênicos ao homem, podendo ser originários de contaminação pós-ordenha ou de infecções do próprio animal, como a mastite (NICOLETTI, 1987).

Mota e colaboradores (2000) definem mastite como sendo a inflamação total ou parcial da glândula mamária causada pela presença de um ou mais microrganismos patogênicos, podendo apresentar-se nas formas subclínica ou clínica. No Brasil, a prevalência da mastite em caprinos tem variado entre 22 e 75%. Na região nordeste, sinais clínicos de mastite em cabras foram relatados em 51,2% dos rebanhos (PINHEIRO et al., 2000); enquanto na região sul 30,8% de metades mamárias caprinas avaliadas, foram positivas para mastite subclínica (MURICY, 2003).

A mastite sub-clínica só é detectada através de análise do leite (LUQUET, 1985) e tem grande impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros (PHILPOT e NICKERSON, 1991), podendo reduzir em 5 a 20% a produção de leite (CREMOUX e MENARD, 1996).

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns em todas as formas de mastite caprina, apresentando uma prevalência que varia de 5,6-17,0% (WHITE e HINCKLEY, 1999), e dados relatados por Silva et al. (2004) no estado do Ceará, demonstraram que em mastites caprinas subclínicas este percentual é de 37%.

O tratamento antibiótico é uma das alternativas recomendadas a fim de reduzir a infecção intramamária e, conseqüentemente, a prevalência da mastite no rebanho (BRITO e BRITO, 1998). Entretanto o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos para o tratamento da mastite ou de qualquer outra infecção pode gerar um aumento do nível de resistência de muitos microrganismos a estas drogas (CONTRERAS et al., 1999).

Os produtos apícolas vêm sendo utilizados na terapia de várias doenças, com a finalidade de alcançar maior eficiência, menor toxicidade e menores efeitos colaterais (MARCUCCI, 1995).

A composição de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA et al., 2004), sua origem geográfica, concentração relativa de seus constituintes, período de coleta e variedades de abelhas *Apis mellifera* (SOUSA e BASTOS, 1999).

A própolis é composta em média por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (GRANGE e DAVEY, 1990). Estudos revelaram que a composição química é complexa, contendo mais de 160 componentes (SEIXAS et al., 2000; SOARES et al., 2000), dentre os quais podem ser citados os flavonóides, chalconas, ácido benzóico e derivados, benzaldeídos, álcoois, cetonas, fenólicos, heteroaromáticos, álcool cinâmicos e derivados, ácido caféico e derivados, ácidos diterpenos e triterpenos, minerais, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais (BANKOVA et al., 2000; SOARES et al., 2000; SAHINLER e KAFTANOGLU, 2005).

Estudos mostraram que componentes individuais da própolis como os flavonóides são responsáveis pelas atividades antiinflamatória e antimicrobiana (ALENCAR et al., 2005).

De acordo com Levy (1999), a atividade da própolis vem sendo comprovada contra um número cada vez maior de microrganismos e seu mecanismo de ação é complexo, não podendo ser feita uma simples analogia com a ação de alguns antibióticos clássicos.

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

Meresta e Meresta (1985) examinaram a sensibilidade de 75 cepas bacterianas ao extrato de própolis. Dessas, 69 foram identificadas como *Staphylococcus* spp exibindo uma elevada sensibilidade para este apiterápico.

O primeiro relato da utilização de própolis no tratamento da mastite foi em bovinos em 1980, sendo realizado pelos pesquisadores Mirolyubov & Barskov (1980).

A própolis revela-se como uma alternativa natural de tratamento das mastites infecciosas, uma vez que vários trabalhos científicos destacam a sua atividade antibacteriana *in vitro* (SANTOS et al., 2002; GAREDEW et al., 2004; ORSI et al., 2005).

Objetivou-se com este estudo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis verde frente a *Staphylococcus* spp isolados de leite de cabras com mastite de propriedades de oito municípios no Estado de Pernambuco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos Animais

Foram avaliadas 262 cabras em lactação, de raças puras e mestiças, em diferentes fases de lactação, primíparas e múltíparas oriundas de 19 propriedades localizadas nos Municípios de Arcoverde, Brejo da Madre de Deus, Garanhuns, Jaboatão dos Guararapes, Paudalho, Olinda, Pedra e São Lourenço no Estado de Pernambuco. Os animais foram examinados de acordo com a técnica preconizada por Dirksen e colaboradores (1993), após a avaliação foram selecionados 90 animais. Após a seleção foi realizada prévia lavagem do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia do óstio do teto com álcool iodado.

As amostras de leite (20 mL) foram colhidas em frascos esterilizados dos animais com mastite clínica positivo ao teste da caneca telada e das cabras com diagnóstico presuntivo de mastite subclínica ao *California Mastitis Tests* (CMT). O leite foi mantido sob refrigeração em caixa isotérmica até o transporte ao laboratório para posterior processamento. As amostras foram processadas no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA da Universidade Federal de Pernambuco.

2.2 Isolamento e identificação

Para o isolamento dos microrganismos, 0,1 mL do leite foi semeado em ágar base acrescido de 8% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas em estufa bacteriológica (National Mastitis Council, 1969). Foram observadas a presença de hemólise em ágar sangue além das características microscópicas de cada colônia isolada pelo método de Gram, como também, foram realizados os testes de catalase em lâmina (QUINN et al., 1994) e coagulase em tubo (SILVA et al., 1997). Após a identificação, as colônias de *Staphylococcus* spp foram repicadas para o caldo BHI

(Brain Heart Infusion) e estocadas em criotubos contendo glicerol na proporção de 1:1m/v e mantidas a – 20 °C para posterior realização dos testes *in vitro*.

As amostras foram reativadas transferindo-se 0,25 mL da cultura estoque para tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth), agitadas e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas. Após esse período foram semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas a 37 °C e imediatamente utilizada para os testes de resistência antimicrobiana.

2.3 Preparo das soluções contendo própolis verde

A própolis verde utilizada neste trabalho foi cedida gentilmente pelo Laboratório Néctar Pharmaceutica® - Belo Horizonte – MG.

Foram preparadas 5 diluições a partir de solução de própolis aquosa lote EPAQ 290606 (15%*m/v*) e etanólica lote 260606 (15%*m/v*) nas seguintes proporções: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 *m/v*.

2.4 Teste de atividade antimicrobiana da própolis verde

Os testes de atividade antimicrobiana da própolis verde foram realizados pelo método de difusão em discos conforme descrito pelo NCCLS (2003). Os discos de papel de filtro (Whatman n. 01) de 6 mm de diâmetro esterilizados foram embebidos com 15 µl das diferentes diluições da solução de própolis aquosa e etanólica. As amostras de *Staphylococcus* spp foram cultivadas em Erlenmeyer contendo 50 mL do caldo triptico de soja (Tryptic Soy Broth - TSB) e foram mantidas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

O inóculo foi incorporado ao ágar Müller Hinton e padronizado para uma absorbância inicial de 0,1 a 600nm no volume final das placas de Petri. Após solidificação do meio de cultura foram colocados 3 discos por placa, embebidos com as diversas diluições dos extratos de própolis verde aquoso e etanólico e sem diluição, incubados a 37 °C por 48 horas.

A leitura foi realizada pela medida do diâmetro dos halos (mm) dos discos com o auxílio de um paquímetro em 24 e 48 horas. A inibição foi indicada pela presença de halo em volta do disco, onde não havia crescimento bacteriano visível. Os controles foram feitos com discos embebidos com etanol e água destilada esterilizada no mesmo volume que foi utilizado para as demais frações de própolis verde.

2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado o protocolo descrito pelo National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003). As soluções estoques (300mg/mL) foram preparadas a partir do extrato seco de própolis (Néctar Pharmaceutica[®] PROPOCAPS[®]) dissolvidos em álcool etílico para a fração etanólica e água destilada esterilizada para a fração aquosa. Foram utilizados tubos de ensaio contendo caldo TSB esterilizado onde foram adicionados volumes específicos das soluções estoques de modo a obter as seguintes concentrações: 200mg/mL, 180mg/mL, 170mg/mL, 150mg/mL, 140mg/mL, 130mg/mL, 120mg/mL e 100mg/mL, para um volume final de 10mL. Culturas de *Staphylococcus* spp incubadas por 24 horas a 37°C em caldo TSB, que apresentaram maior diâmetro de halo nos ensaios de atividade antimicrobiana, foram inoculados de modo a obter uma absorbância a 600nm de 0,1 e adicionadas a cada tubo de ensaio nas diferentes concentrações de própolis verde. Os ensaios foram realizados em triplicata e o controle foi feito pelo cultivo dos isolados bacterianos em tubos de ensaio contendo caldo TSB sem a própolis.

A CIM foi definida como a menor concentração de própolis verde que inibiu completamente o crescimento bacteriano. O efeito bactericida foi considerado pela não turvação do meio de cultura nos tubos de ensaio e não crescimento bacteriano após inoculação em placas de Petri contendo ágar Müller Hinton enquanto que o efeito bacteriostático foi definido para aquelas concentrações que macroscopicamente não apresentavam turvação do meio de cultura, mas crescimento após cultivo em ágar Müller Hinton.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico *Statistica 6.0* da StatSoft, Inc. avaliados pelo teste t de *Student* onde $p < 0,01$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 123 amostras de leite estudadas foram isoladas 68 bactérias das quais 45 (66,2%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp. Das amostras de *Staphylococcus* spp, 26,7% dos isolados foram coagulase positivos (SCP) e 73,3% coagulase negativa (SCN). Esses achados estão de acordo com os obtidos por Silva e colaboradores (2004) que encontraram cerca de 60% de SCN em cabras com mastite clínica no município de Sobral - CE e Bochev e Russenova (2005) que encontraram no sudeste da Bulgária índices de SCN (80,2%) e SCP (19,8%), respectivamente, discordando daqueles encontrados por Santos et al. (2007) que obtiveram 29% de SCN em três capris na região da Grande Porto Alegre – RS.

De acordo com Contreras e colaboradores (2007) as espécies do gênero *Staphylococcus* são os principais agentes etiológicos envolvidos em todas as formas de mastite em cabras, confirmando os resultados obtidos neste estudo.

Os resultados da atividade antimicrobiana da própolis verde (fração aquosa e etanólica) frente às amostras de *Staphylococcus* spp de leite de cabras com mastite estão apresentados nas figuras 2 ,3 e 4.

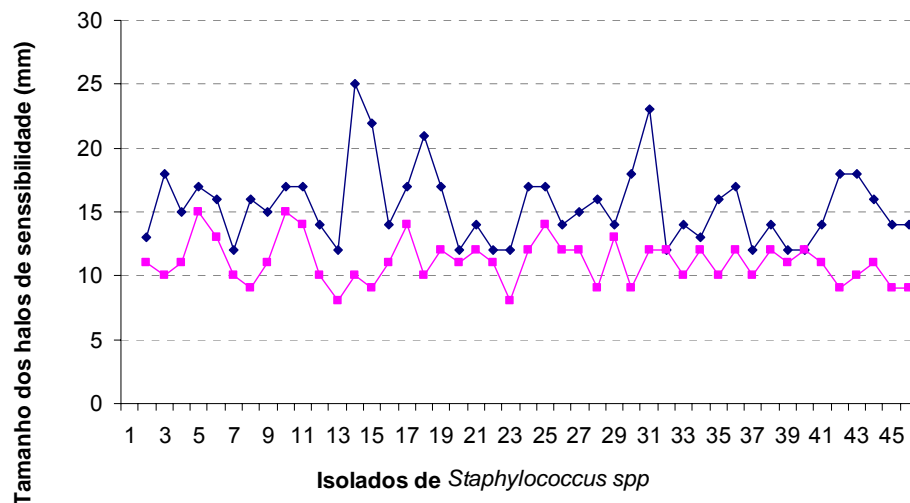


Figura 2: Atividade antimicrobiana (halos de inibição) da fração alcoólica (◆) e aquosa (■) da própolis verde (15% m/v) frente aos isolados de *Staphylococcus spp* de mastite caprina de rebanhos de 08 municípios do Estado de Pernambuco

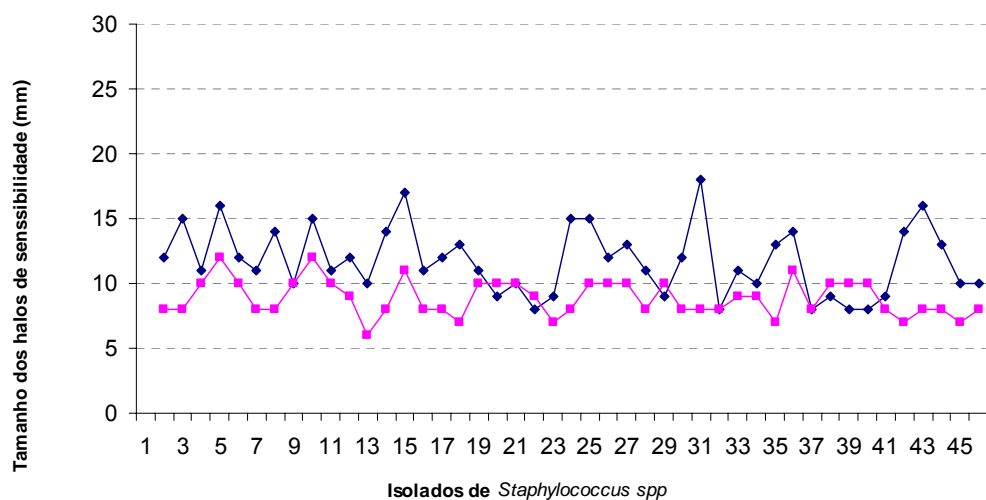


Figura 3: Atividade antimicrobiana (halos de inibição) da fração alcoólica (◆) e aquosa (■) da própolis verde (diluição 1:2 m/v) frente aos isolados

de *Staphylococcus* spp de mastite caprina de rebanhos de 08 municípios do Estado de Pernambuco

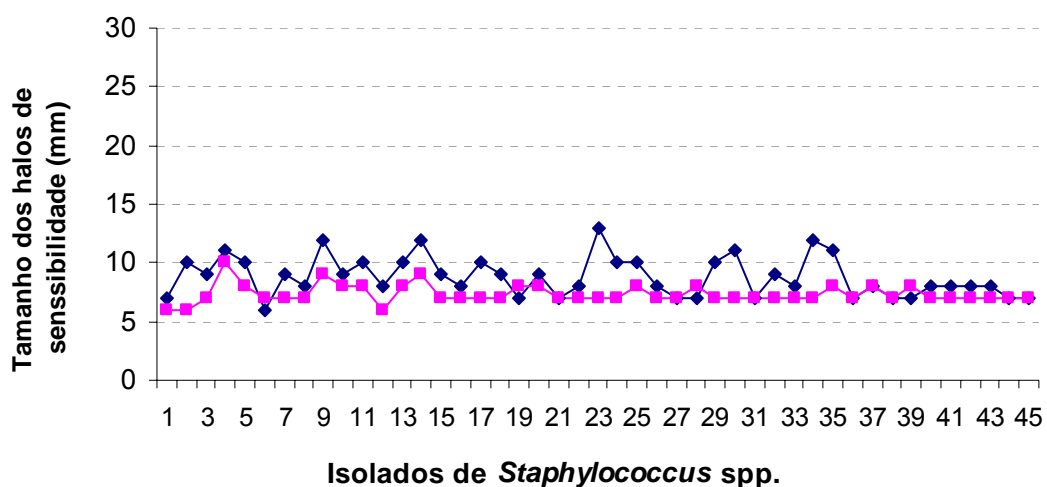


Figura 4: Atividade antimicrobiana (halos de inibição) da fração alcoólica (♦) e aquosa (■) da própolis verde (diluição 1:4m/v) frente aos isolados de *Staphylococcus* spp de mastite caprina de rebanhos de 08 municípios do Estado de Pernambuco

Todos os isolados de *Staphylococcus* spp recuperados das cabras com mastite foram sensíveis aos extratos aquoso e etanólico de própolis verde sem diluição (15% m/v) e nas diluições de 1:2 e 1:4 m/v.

Estes dados estão de acordo com os apresentados por Vargas e colaboradores (2004) que testaram o extrato de própolis obtidos de apiários comerciais da região de Santa Maria–RS à uma concentração de 50% (m/v) em álcool etílico 96°GL, obtendo 97,83% de eficácia frente aos isolados de *Staphylococcus* sp provenientes da bacterioteca do laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria. Diverge dos resultados apresentados por Pinto e colaboradores (2001), que relataram que o extrato aquoso (10% p/v) de própolis verde produzido por sistema CPI[®] (Coletor de Própolis Inteligente) não exerceu nenhum efeito

antimicrobiano *in vitro* frente às amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, isolados de leite de vaca com mastite da Zona da Mata de Minas Gerais, atribuindo à não solubilização pela água, dos componentes ativos com capacidade antibacteriana da própolis verde, por esta ser de alta polaridade. A diferença entre os dados encontrados deve-se possivelmente à concentração utilizada, uma vez que o mesmo autor relata ter havido atividade antibacteriana na fração etanólica de mesma concentração (10% p/v).

Os diâmetros médios dos halos de inibição do crescimento de *Staphylococcus* sp coagulase positivo (SCP) ao extrato etanólico de própolis verde (15 % m/v) variaram de 7 a 23 mm com média 15 mm enquanto que para os *Staphylococcus* sp coagulase negativo (SCN) variaram de 6 a 25 mm com média 15,5 mm de diâmetro .

Brunfitt e colaboradores (1990) testando a atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde na concentração de 10% (m/v) conseguiram halos de inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* que variaram entre 7 e 14 mm (média 13mm) enquanto que Pinto e colaboradores (2001) encontraram halos que variaram de 8,66 a 11,16mm, apresentando, estes últimos, menores que as observadas neste trabalho. De Paula e colaboradores (2006), testando própolis verde na concentração de 20% (m/v) obtidos da Néctar Pharmaceutica[®], frente a 16 microrganismos patogênicos da cavidade oral, obtiveram halos de inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* de 16,3 mm de diâmetro em média estando estes achados muito próximos aos obtidos neste estudo. Estes dados vêm ratificar a importância quanto a concentração, ao local de obtenção e às peculiaridades de cada própolis.

Observou-se que 100% das amostras foram susceptíveis às frações etanólica e aquosa para uma concentração final de 100mg/mL corroborando com a encontrada por Santos e colaboradores (2002) que encontraram uma concentração mínima inibitória que variou de 0,064 a 102,4mg/mL para 9 microrganismos anaeróbicos frente a frações de extrato aquoso-etanólico de própolis do Estado de Minas Gerais.

Comparando os halos encontrados entre os tratamentos com as soluções de própolis, observou-se que estes valores não possuem diferença significativa quando avaliados pelo teste t de *Student* onde $p < 0,01$.

Em trabalho realizado *in vitro* com bactérias isoladas do leite de vacas com mastite, Pinto (2001) relatou que os extratos etanólicos de própolis inibiram o crescimento das amostras de bactérias Gram positivas, corroborando com os dados obtidos nesta pesquisa, uma vez que em todas as concentrações testadas (100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 e 200 mg/mL) foi observado efeito bactericida frente aos isolados de *Staphylococcus spp.*

4. CONCLUSÕES

A atividade antimicrobiana da própolis verde observada neste estudo abre perspectivas, no sentido de se desenvolver um apiterápico eficaz e de baixo custo, para o tratamento e controle das mastites caprinas causadas por *Staphylococcus spp.*

REFERÊNCIAS

ALENCAR, S. M. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais, **Ciência Rural, Santa Maria**, v.35 n.4 July/Aug. 2005.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Versailles, v.31, p. 3-15, 2000.

BOCHEV, I. & RUSSENOVA, N. Resistance of *Staphylococcus* SPP. Strains isolated from goats with subclinical mastitis. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 8, n.2, p. 109-118, 2005.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. O efeito da mastite no leite. In: BRITO, J.R.F., DIAS, J.C. A qualidade do leite. Juiz de Fora: Embrapa, 1998. p. 83- 90.

BRUNFITT, W., HAMILTON-MILLER, J.M.T., FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1. **Propolis. Microbios**, n.62, p.19-22, 1990.

CONTRERAS A.; PAAP, M.J.; MILLER, R.H. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 31, p. 203-208, 1999.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research, Amsterdam**, v. 68, p. 145–153, 2007.

CREMOUX, R.; MENARD, J.L. Influence des infections mammaires sur la quantité de lait et les taux. **Reussir - La Chevre**, n. 213, p. 32 - 34, 1996.

DE PAULA, A. M. B. et al. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to Brazilian Green Propolis Extract, **Pharmacology on line**, [S. l.] v.3 p. 467-473 2006.

DIRKSEN, G. et al. **Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. São Paulo: Guanabara, 1993, 420p.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v.422, p.115-124, 2004.

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

LEVY, N.C. Atividade antimicrobiana da própolis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS, 1. 1999. Franca, **Revista da Universidade de Franca**, Franca, n.7, p.18, 1999.

LUQUET, F.M. **Do úbere à fábrica de laticínios**. Sintra: Europa-América, v. 1. 1985, 444 p.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. **Antioxidant activity of própolis of various geographic origins**, Food chemistry, v.84, n.3, p.329-339, 2004.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Versailles, v.26, n.2, p. 83-99, 1995.

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.

MIROLYUBOV, M.G.; BARSKOV, A.A. Propolis for bovine mastitis. **Veterinary**, 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 potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.

MOTA, R.A.; DE CASTRO, F.J.C.; DA SILVA, L.B.G.; OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 19, n. 114, p. 26 – 29, 2000.

MURICY, R.F. **Ocorrência de mamite subclínica em caprinos e qualidade higiênicosanitária do leite produzido em propriedades associadas à Coopertativa Languiru, Teutônia - RS**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 83 f. 2003.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis**. Washington D. C.: University of New Hampshire Press, 1969, 27p.

NCCLS - NATIONAL COMITÉ CLINICAL LABORATORY STANDARDS Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, **Wayne, Pennsylvania** 19087-1898 USA, 2003.

NICOLETTI, P. Goat disease and human health. In: INTERNATIONAL CONFERENCES ON GOATS, 4., 1987, Brasilia. **Proceedings...** Brasília, DF: EMBRAPA, v. 1, p. 491 – 511. 1987.

ORSI, R. O. et al. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against salmonella Typhimurium. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v5, p.359-368, 2005.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: counter attack**. Naperville: Bobson Bros, 150 p. 1991.

PINHEIRO, R. R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p. 534 - 543, 2000.

PINTO, M. S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, vol. 38, n.6, 2001.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology**. 1. ed. cidade: Wolfe, 1994, 648 p

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research** , Abingdon, v.19, n.2, p. 183-188, 2005.

SANTOS, F. A. et al. Antibacterial activity of Brazilian própolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 80, p. 1-7, 2002.

SANTOS A. R.; SCHERER S.; SCHMIDT V. Validação da contagem de células somáticas e do California Mastitis Test como método diagnóstico da mastite

subclíca em caprinos caprinos. P. 1 - 15 Disponível em: <http://www.cav.udesc.br/2004_1/mamite.pdf > acesso em 14 de fevereiro de 2007.

SEIXAS, F.R.M.S. et al. Composição química da própolis brasileira das regiões sul e sudeste. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas, **Resumos...** Poços de Caldas, [s.n.] v.2, 50 p. 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 295p. 1997.

SILVA, E. R. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.55 p. 45–49 2004.

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, v.2, PN-054. 2000.

SOUSA, M.L.; BASTOS, J.K.I. Isolamento de alguns componentes da própolis. **Revista da Universidade de Franca**, Franca, v.7, n.7, p.40, 1999.

VARGAS A. C, A. P. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 34 n.1, p.159-163. 2004.

WHITE, E.C.; HINCKLEY, L.S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 33, p.117–121. 1999.