

CRISTIANE DA SILVA DE SOUZA CORRÊA

**NANOPRÓPOLIS NO TRATAMENTO DA MASTITE
SUBCLÍNICA BOVINA: AVALIAÇÃO *in vivo* DA EFICÁCIA
VIA INTRAMAMÁRIA DURANTE O PERÍODO DE
LACTAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina como um dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Agroecossistemas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Shirley Kuhnen
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Aparecida Honorato

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

CORRÊA, CRISTIANE DA SILVA DE SOUZA
NANOPRÓPOLIS NO TRATAMENTO DA MASTITE SUBCLÍNICA
BOVINA: AVALIAÇÃO IN VIVO DA EFICÁCIA VIA
INTRAMAMÁRIA DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO /
CRISTIANE DA SILVA DE SOUZA CORRÊA ; orientadora,
Shirley Kuhnen, coorientadora, Luciana Aparecida
Honorato, 2018.
90 p.

Dissertação (mestrado profissional) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Agroecossistemas, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Própolis. 3. CCS. 4.
antimicrobianos. 5. qualidade do leite. I. Kuhnen,
Shirley . II. Honorato, Luciana Aparecida. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.

Cristiane da Silva de Souza Corrêa

**NANOPRÓPOLIS NO TRATAMENTO DA MASTITE
SUBCLÍNICA BOVINA: AVALIAÇÃO *in vivo* DA EFICÁCIA
VIA INTRAMAMÁRIA DURANTE O PERÍODO DE
LACTAÇÃO**

Esta dissertação foi aprovada em sua forma final pelo(a) orientador(a) e pelos membros da banca examinadora e julgada adequada para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação – Mestrado Profissional em Agroecossistemas.

Florianópolis, 20 de abril de 2018.

Prof^a Dr^a Patrizia Ana Bricarello
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Luciana Aparecida Honorato
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof^a Dr^a Patrizia Ana Bricarello
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch
Universidade Federal de Pelotas - UFPel

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo **Everton** por todo amor, compreensão, amizade, cumplicidade, e que sempre me apoiou e incentivou a buscar todos os meus sonhos, compartilhando momentos bons e difíceis nessa jornada, tornando nosso convívio cada dia mais sólido e harmonioso.

Aos meus filhos **Cauê** e **Amanda**, meus maiores tesouros, razões da minha vida e o motivo de toda minha dedicação e esforço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, que sempre conduziu meus passos, sem o qual eu nada seria.

Às minhas orientadoras, **Prof.^a Dr.^a Shirley Kuhnen e Prof.^a Dr.^a Luciana Aparecida Honorato**, pelos ensinamentos que muito auxiliaram para construção deste trabalho, e por terem me convidado a participar do andamento de seus estudos e projetos acadêmicos.

À minha **família**, pelo apoio, amor e confiança, sempre acreditando muito em mim.

Ao meu **esposo** Everton, e **filhos** Cauê e Amanda, pela compreensão, sempre me apoiando durante todo período que dediquei ao estudo e planejamento deste trabalho de pesquisa, e em todos os momentos de minha vida.

Aos meus **pais**, Anita e Jorge, pelo amor e por terem sempre me incentivado aos estudos, colaborando decisivamente para minha formação.

A toda a **coordenação** do curso e **professores** por todo suporte e ensinamento.

Aos produtores que aceitaram participar deste estudo, Senhor Raimundo, Aparecido, Jorge e Antônio, que tornaram possível a realização deste projeto.

E **aos animais** que participaram desta pesquisa, pela tranquilidade durante todo o processo de campo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que eu pudesse chegar ao fim de uma realização.

Em especial meus agradecimentos ao **MST**, por ter me auxiliado em toda esta trajetória, e depositado em mim confiança e convicção de que a luta tem que ser pra valer!

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro (processo nº403415/2013-6).

Muito Obrigada!

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a eficácia de nanopartículas de própolis originária de Urupema-SC, após infusão intramamária, no tratamento da mastite subclínica bovina. O experimento foi realizado em quatro unidades familiares de produção leiteira de 2 municípios do estado de São Paulo. Foram analisados 81 quartos mamários de 45 matrizes, entre 3 a 10 anos, em período de lactação de 2 a 6 meses. A triagem prévia dos casos de mastite subclínica foi efetuada por meio do *California Mastitis Test* (CMT). Análises de contagem de células somáticas (CCS) foram realizadas para confirmação do escore de CMT. Os quartos mamários com mastite subclínica foram distribuídos em dois grupos: (1) tetos que receberam 20 mL das nanopartículas de própolis (5mg/mL) (n= 39) e (2) tetos que não receberam nenhum tipo de tratamento, nem mesmo o veículo (n=42). Após um experimento piloto, o tratamento foi realizado nas outras três propriedades por 3 dias consecutivos, com aplicações a cada 12 horas, durante a ordenha. O monitoramento do tratamento foi realizado durante e após o término através da contagem de CCS. Foram considerados apenas os tetos que apresentaram CCS >200,000 cels/ml. Os valores médios da CCS das amostras de leite, tanto do grupo que recebeu o tratamento como daquele que não recebeu, mantiveram-se acima da contagem preestabelecida, ou seja, acima de 200.000 células/ml por quarto mamário. Portanto, a concentração de nanoprópolis para o tratamento de mastite subclínica utilizada neste estudo não modificou a condição quando comparada ao grupo controle. Durante o tratamento, um aumento na contagem de CCS nos quartos mamários tratados foi observado, o qual regrediu após o seu término. Em ambos os grupos houve uma diminuição da CCS ao longo do tempo, viés que surge devido às melhorias das condições de manejo e uma melhor assepsia por parte dos produtores, possivelmente provocadas pela participação no presente estudo.

Palavras-chave: própolis, CCS, quartos mamários, antimicrobianos, qualidade do leite.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the efficacy of propolis nanoparticles from Urupema-SC, after intramammary infusion, in the treatment of subclinical mastitis bovine. The experiment was carried out in four dairy family farms of two municipalities in the state of São Paulo. A total of 81 mammary glands from 45 animals, ranging from 3 to 10 years old, were analyzed in a lactation period of 2 to 6 months. The screening of cases of subclinical mastitis was performed using the California Mastitis Test (CMT). Somatic cell counts (CCS) were performed to confirm the CMT score. The mammary glands with subclinical mastitis were distributed into two groups: (1) teats that received 20 mL of propolis nanoparticles (5 mg/mL) (n= 39) and (2) teats that received no treatment, not even the vehicle (n= 42). After a trial experiment, the treatment was carried out in 3 farms for 3 days, with applications every 12 hours, during milking. Treatment monitoring was performed through the CCS count. Only those teats with $CCS > 200,000$ cells/ml were considered. The mean CCS values of the milk samples of both the treatment group and the non-treated group remained above the pre-established count, above 200,000 cells/ml per mammary gland. Therefore, the concentration of nanopropolis for the treatment of subclinical mastitis used in this study did not modify the condition when compared to the control group. During treatment, an increase in CCS count in the treated mammary glands was observed, which regressed after its completion. In both groups there was a decrease in CCS over time, a bias that arose due to improvements in management conditions and a better asepsis on the part of producers, possibly due to participation in the present study.

Key words: propolis, CCS, mammary gland, antimicrobials, milk quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparação dos extrato de própolis (A) antes e (B) após adição do solvente.	43
Figura 2. Pesagem do extrato (A), Lecitina e Poloxamer (B), preparação aquosa sob agitação magnética (C e D), evaporador rotativo (E, F).	44
Figura 3. Procedimentos de assepsia do teto com álcool (A), administração intramamária (B e C) e seringas para aplicação 20 ml (D).	49
Figura 4. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) (N=12) durante 7 dias e não tratadas (N=12), antes do início do tratamento (0) e após 3, 7 e 14 dias do tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os animais do GT comparado aos do GNT (P<0,05).	57
Figura 5. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) durante 3 dias (n=14) e não tratadas (n=20), antes do início do tratamento (0) e após 5, 15, 25 e 33 dias do tratamento na unidade de produção 2.	59
Figura 6. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) (n=8) durante 3 dias e não tratadas (n=6), antes do início do tratamento (0) e após 2, 21, 42 e 63 dias do tratamento na unidade de produção 3. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os animais do GT comparado aos do GNT (P<0,05).	60
Figura 7. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) (n=5) durante 3 dias e não tratadas (n=4) antes do início do tratamento (0) e após 7, 14, 35 e 49 dias do tratamento na unidade de produção 4.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação padrão das nanopartículas de própolis 5%.....	44
Tabela 2. Período do estudo <i>in vivo</i> em cada Unidade de Produção.	45
Tabela 3. Período de administração intramamária da nanoprópolis.....	48
Tabela 4. Período de tratamento e tempo de monitoramento em cada Unidade de Produção.	50
Tabela 5. Número de animais e quartos mamários com CMT positivo inicial maior > 2 (++).....	53
Tabela 6. Produção de volumoso para suprir a época da seca.....	54
Tabela 7. Espécies e ocupação de área das pastagens nas Unidades de Produção.....	54
Tabela 8. Média produção leite de cada Unidade de Produção.....	55

LISTA DE ABREVIACÕES

L- Litro

Kg- Quilograma

Mg- Miligrama

Hrs - Horas

mL- Mililitro

CCS- Contagem de Células Somáticas

CBT- Contagem Bacteriana Total

CMT- Califórnia Mastitis Test

GT- Grupo Tratado

GNT- Grupo não Tratado

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DP- Desvio Padrão

EH- Extrato Hidroalcoólico

IC- Concentração Inibitória

IN- Instrução Normativa

SC- Santa Catarina

TVS- Terapia de Vaca Seca

UFC- Unidades Formadoras de Colônia

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

Mg - micrograma

P- Propriedade

ha- Hectare

TVS- Terapia da Vaca Seca

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	25
	2.1 Objetivo Geral.....	25
	2.2 Objetivos específicos	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	27
	3.1 Contextualização.....	27
	3.2 Anatomia e fisiologia da glândula mamária.....	28
	3.3 Importância da qualidade do leite	29
	3.4 Mastite.....	30
	3.5 Incidências de <i>Staphylococcus aureus</i> na mastite subclínica.....	32
	3.6 Contagem de Células somática - CCS.....	33
	3.7 Terapia antimicrobiana e resíduos em alimentos de origem animal	34
	3.8 Resistência bacteriana e seu efeito na saúde pública	36
	3.9 Própolis	38
	3.10 Nanotecnologia	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
	4.1 Própolis	43
	4.2 Preparação da Nanoprópolis	44
	4.3 Seleção das Unidades de Produção para realização do experimento <i>in vivo</i>	45
	4.4 Delineamento experimental	46
	4.4.1 Seleção e participação.....	46
	4.5 Estudo <i>in vivo</i>	46
	4.5.1 Diagnóstico inicial da mastite subclínica:.....	46
	4.5.2 Número de animais e tetos	47
	4.5.3 Coleta e análise das amostras de leite	47
	4.5.4 Tratamento.....	48
	4.5.5 Avaliações de segurança.....	50
	4.6 Análise dos dados.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
	5.1 Caracterização das unidades de produção.....	53
	5.2 Estudo <i>in vivo</i> da eficiência da nanoprópolis no tratamento da mastite subclínica bovina.....	55
	5.3 Ensaio piloto com nanoprópolis (5 mg/mL) - 7 dias de tratamento (12/12 h).....	56

5.4 Ensaio <i>in vivo</i> com nanoprópolis (5 mg/mL) –3 dias de tratamento (12/12 h):	57
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	67
ANEXO 01: Certificado de Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais	83
APÊNDICES A - Declaração de consentimento.....	87
APÊNDICE B- Roteiro para Coleta de Dados (Caraterização da Atividade Leiteira).....	89

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de leite tem se tornado uma atividade cada vez mais importante e competitiva. Desse modo, a busca por alternativas para os fatores que interferem na qualidade e produtividade do setor são de grande interesse (COLDEBELLA et al., 2004).

Dentre os principais problemas da cadeia produtiva do leite, estão os sanitários, com destaque para a mastite. Esta é responsável por causar grande impacto tanto na qualidade como na quantidade de leite produzido pelo animal. A mastite é resultado de um processo inflamatório da glândula mamária, geralmente proveniente de origem infecciosa, traumática ou tóxica. A doença pode se manifestar na forma clínica ou subclínica. Na forma subclínica, ao contrário da clínica, não há sinais aparentes da infecção, havendo a necessidade de se realizar testes para a sua identificação (SANTOS; ALESSI, 2010), porém, acarreta em perdas invisíveis devido à queda na produção de leite.

O controle da mastite no rebanho é complexo por suas diversas origens e por agentes etiológicos responsáveis pela infecção. Vários são os tratamentos empregados para o seu controle. O uso de antimicrobianos sintéticos, tanto sistêmicos como locais, são os mais frequentes, porém, os mesmos têm sido utilizados sem controle, tanto na dosagem, quanto na carência indicada pelo fabricante.

A terapêutica convencional preconiza que o tratamento da mastite subclínica seja feito no período de secagem da vaca e não durante a lactação, devido ao alto custo de tratamento, tempo de descarte prolongado do leite pelo risco de resíduos antimicrobianos e baixa taxa de cura durante a lactação. É importante ressaltar que a aplicação de antimicrobianos no período de secagem das vacas, chamada de terapia da vaca seca (TVS), é feita tanto em vacas que tiveram mastite quanto em vacas sadias. Nesse caso, o tratamento é para a prevenção de possíveis infecções na próxima lactação. No entanto, o uso indiscriminado de tais produtos pode ter como consequência a transferência dos mesmos ao consumidor através do leite, bem como acarretar na resistência dos agentes etiológicos.

A presença de resíduos de medicamentos nos alimentos é um problema de saúde pública que tem causado diversos prejuízos à saúde humana. Nesse sentido, há evidências de que os antimicrobianos em alimentos de origem animal têm influenciado no possível aparecimento

de resistência bacteriana no trato digestivo dos seres humanos (SPINOSA; CÓRNIA; BERNARD, 2002).

Em contraponto a este cenário, há uma preocupação crescente por parte da população em adquirir alimentos de qualidade e livres de resíduos químicos, justificando-se a busca por métodos alternativos para o controle sanitário dos animais, com destaque aos produtos naturais. Dentre eles, a própolis é reconhecida por sua diversidade de princípios ativos, responsáveis por diferentes atividades, incluindo antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2005), antitumoral, antiviral, anestésica, cicatrizante (PARK et al., 2002b) e anti-inflamatória (DOBROWOLSKI et al., 1991). A fitoterapia com a própolis destaca-se pela sua aplicação em diversas áreas que envolvem animais, desde o controle de verminoses em coelhos até no tratamento curativo da pododermite necrótica em ovinos (MOURA et al., 1998; SILVA SOBRINHO et al., 2004).

Na bovinocultura leiteira, muitos trabalhos têm mostrado o efeito antimicrobiano da própolis contra bactérias isoladas de leite mastítico (PINTO et al., 2001; BACIC et al., 2016; FIORDALISI et al., 2016). Entretanto ainda são poucos os trabalhos científicos que avaliaram *in vivo* a eficácia da administração intramamária dos extratos de própolis. Recentemente, um estudo conduzido na Croácia, avaliou o efeito intramamário de uma formulação de própolis não-alcoólica em vacas com mastite subclínica durante a lactação. Os autores encontraram após 3 aplicações, com intervalo de 12 horas, uma diminuição significativa no número de CCS (BACIC et al., 2016). Porém, encontraram danos teciduais em formulações com 10% de própolis, o que os levaram a reduzir para 1%. Estudos *in vitro* demonstram melhor atividade antimicrobiana em formulações com nanopartículas de própolis, quando comparadas ao extrato etanólico de própolis (AFROUZAN et al., 2012), devido ao tamanho reduzido das nanopartículas que resultam em propriedades físico-químicas diferenciadas.

Em relação ao grupo proponente deste projeto de pesquisa, cabe destacar que os estudos sobre o potencial da própolis no tratamento da mastite bovina foram iniciados em 2013. Inicialmente, foi possível identificar entre extratos de própolis de diferentes origens de Santa Catarina, através de testes *in vitro*, aquele com maior potencial antimicrobiano e menor toxicidade aos explantes da glândula mamária bovina (FIORDALISI et al., 2016). Com base nesses resultados, um segundo estudo foi conduzido visando o desenvolvimento de uma formulação contendo nanopartículas do extrato de própolis previamente

selecionado, permitindo assim a sua aplicação intramamária (PINHEIRO MACHADO, 2017a e 2017b). Dentre as nanopartículas de própolis desenvolvidas, foi possível estabelecer uma correlação entre a atividade antimicrobiana e o potencial citotóxico às células epiteliais mamárias, visando à eficiência e a segurança do produto para o tratamento de animais com mastite subclínica, objeto de pesquisa da presente proposta. Vale ressaltar que na mastite subclínica são verificados os maiores prejuízos econômicos, uma vez que a produção de leite é reduzida, não havendo um tratamento preconizado a ser adotado durante a lactação. Nesses casos, os animais são tratados somente durante o período de secagem, através do uso de antibióticos locais (BRADLEY; GREEN, 2001).

Diante desta situação, a busca por alternativas economicamente viáveis e limpas representam a melhor opção, principalmente para a produção de leite orgânico e/ou agroecológico que tem sido, em alguns locais do Brasil, como em Santa Catarina, o sistema de produção adotado pela agricultura familiar. Empregando-se produtos naturais no tratamento da mastite bovina, espera-se reduzir o risco de resíduos no leite e realizar o tratamento durante a lactação assim que a infecção for detectada, permitindo o retorno da funcionalidade da glândula mamária.

Em face dessas considerações, o presente estudo tem como objetivo dar continuidade ao estudo iniciado em 2013, através da avaliação do uso de nanopartículas de própolis, do Planalto de Santa Catarina, para o tratamento intramamário da mastite subclínica, em matrizes bovinas em período de lactação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso de nanoprópolis no controle da mastite subclínica, em matrizes bovinas em período de lactação, através da administração intramamária.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar vacas em período de lactação com mastite subclínica através do teste do CMT.
- ✓ Realizar o tratamento dos animais com mastite subclínica com nanoprópolis.
- ✓ Acompanhar a eficácia do tratamento através do teste do CMT e Contagem das Células Somáticas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Contextualização

A mastite é a doença infecciosa mais disseminada na atividade leiteira, causando grande impacto ao produtor e aos laticínios. Esta é responsável pela redução da produção de leite, por afetar a sua qualidade, além de aumentar os custos com tratamentos e até mesmo acarretar no descarte precoce de animais acometidos com a doença (MÜLLER, 2000).

No Brasil, a ocorrência de mastite nos estados de São Paulo e Minas Gerais, por exemplo, é de 72% para mastite subclínica e 17,5% para mastite clínica (COSTA et al., 1995a, 1995b). Estima-se que para cada caso clínico da enfermidade ocorram 35 casos de subclínica (FONSECA; SANTOS, 2000). De fato, este tipo de mastite é o que mais preocupa, por ser de difícil identificação, uma vez que os animais não apresentam sintomas visíveis. As perdas econômicas decorrentes desse tipo de mastite podem chegar a 70 e 80% (MÜLLER, 2000; SANTOS, 2001).

De maneira geral, os principais fatores responsáveis pelos prejuízos ocasionados pela mastite são as perdas de produção do leite devido à mastite subclínica; os custos dos casos clínicos; os custos de descarte e morte prematura dos animais e os prejuízos da indústria em virtude da redução na qualidade e no rendimento industrial de derivados (SANTOS, 2001). Nos Estados Unidos, os custos da mastite são de aproximadamente US\$ 180/vaca/ano (MAGALHÃES et al., 2006). No Brasil, estima-se a perda de 2,8 bilhões de litros de leite/ano (FONSECA; SANTOS, 2000), e custos de US\$ 317,28/vaca/ano e US\$ 20.611,32 por propriedade/ano em decorrência da mastite subclínica (COSTA et al., 1999).

Além das perdas econômicas significativas dos rebanhos leiteiros ocasionadas pela mastite, são também preocupantes os possíveis efeitos sobre a saúde pública, pela possibilidade de veiculação de microrganismos, toxinas e resíduos antimicrobianos no leite e derivados. Este consumo pode, por exemplo, levar a diversos problemas, incluindo manifestações de hipersensibilidade (ANDRADE; GIUFFRIDA; RIBEIRO, 2001). Desse modo, as normas IN 007 e IN 051 do MAPA (Brasil 1999, 2002), sobre os critérios de qualidade do leite, estabelecem que seja proibida a presença de quaisquer resíduos de produto antimicrobiano no leite ou carne. Quando houver a necessidade

de utilização destes princípios ativos, fica-se sob pena de imediato descarte do leite, de acordo com a classificação de carência do produto. No mais, é de extrema relevância ressaltar que boas práticas agropecuárias na bovinocultura de leite são importantes para minimizar os riscos de agravos nas diferentes etapas do processo de produção do mesmo (JULIANO et al., 2007).

Diante do grave problema que a mastite representa para a cadeia produtiva do leite, é de interesse a busca por alternativas no controle e tratamento da doença. Nesse sentido, o emprego de plantas medicinais tem sido explorado pelo homem e constitui o alicerce da medicina tradicional. Isto porque os produtos naturais constituem uma fonte importante de diversidade química que pode ser utilizada no tratamento de inúmeras doenças que acometem o ser humano e também os animais (GOMES, 2011; PHILLIPSON et al., 1997).

As plantas sintetizam e armazenam diversos princípios ativos (ALMEIDA, 2012), os quais são chamados de metabólitos secundários. Entre eles, os mais comuns são os alcalóides, flavonóides, fenólicos, saponinas, taninos, terpenóides e óleos essenciais (ZACARÃO, 2012). Esses compostos podem ser utilizados para fins terapêuticos, podendo substituir o uso de compostos químicos sintéticos, minimizando os impactos destes no meio ambiente e nos produtos de origem animal (MARQUES et al., 2010; ROYER et al., 2013).

3.2 Anatomia e fisiologia da glândula mamária

O úbere de bovinos é formado por um conjunto de quatro glândulas funcionais e quatro tetas, caracterizado com a pele coberta por pelos finos e o teto completamente sem pelos (FRANDSON et al., 2010). Cada teto drena uma glândula, referidas como quarto, separadas por tecido conjuntivo (PARK; ACOBSON, 1993). O elemento secretor da glândula, chamado de parênquima, é constituído por células epiteliais secretoras de leite. Os alvéolos são as unidades secretoras, apresentando toda estrutura necessária para a síntese e secreção de leite para o lúmen alveolar e, em seguida, para o sistema de ductos (SANTOS; FONSECA, 2007). De acordo com Frandson et al., (2010), os vários ductos convergem e terminam em um reservatório, o seio lactífero, também conhecido em duas partes, cisterna da glândula e cisterna do teto. A cisterna do teto se comunica com o exterior por meio do ducto papilar, normalmente chamado canal do teto, que é composto de células queratinizadas. O canal do teto se abre como óstio papilar, permanecendo fechado entre cada ordenha por grupo de fibras musculares que formam o esfíncter.

A sustentação da glândula mamária é realizada por um sistema de apoio do úbere, composto pela pele e por anexos de ligamentos. As estruturas primárias são os ligamentos suspensórios lateral e medial (SANTOS; FONSECA, 2007). O ligamento suspensório médio, a mais importante sustentação do úbere, é formado por duas lamelas de tecido conjuntivo flexível, unindo a glândula à parede abdominal e à pelve. Os ligamentos suspensórios laterais são constituídos de tiras fibrosas, não elásticas, originando numerosas lamelas que penetram a glândula e se tornam contínuas com o tecido intersticial do úbere, inserindo nos ossos púbicos e tendões abdominais (PARK; JACOBSON, 1993). A síntese de leite requer grande quantidade de nutrientes, que são fornecidos pelo sangue que circula constantemente na glândula. O sistema venoso drena a glândula mamária em três troncos: veia subcutânea 13 abdominal (veia do leite), veia pudenda externa e veia perineal (SANTOS; FONSECA, 2007). A retirada do leite da glândula mamária ocorre através de um reflexo neuro-hormonal, o qual estimula as células mioepiteliais (músculo liso) que envolvem os alvéolos, a contraírem. A vaca é estimulada (mão do ordenhador, rotina de horário, barulho da ordenha, visualização do bezerro), esses estímulos ativam os receptores nervosos da pele, os quais enviam estímulo até a medula espinhal, de lá até o hipotálamo, este por fim libera a ocitocina, que se liga aos receptores das células mioepiteliais e através deles promove a contração do músculo liso e conseqüentemente a ejeção do leite (PARK; JACOBSON, 1993; SANTOS; FONSECA, 2007). A glândula mamária é um órgão diferenciado e metabolicamente ativo, sendo que no início da lactação acontecem inúmeras alterações que fazem com que o metabolismo se retorne quase totalmente para esta glândula.

3. 3 Importância da qualidade do leite

A qualidade do leite está diretamente relacionada com o tipo de manejo adotado durante o meio de produção, independentemente do nível tecnológico da propriedade. O leite através de seus constituintes é um excelente meio para o crescimento de vários grupos de microrganismos desejáveis e indesejáveis (JESUS, 2013). A presença de microrganismos patogênicos em desequilíbrio provoca alterações físico-químicas no leite, tais como enzimas proteolíticas, sais e acidez, o que acaba reduzindo as propriedades desejáveis deste alimento, como

proteína, gordura e lactose (PHILPOT; NICKERSON, 2000; PEREIRA et al., 2010).

A aplicação de boas práticas na produção e no beneficiamento é essencial para a obtenção de produtos com qualidade nutricional e garantia de inocuidade para o consumidor (FERREIRA, M., 2007). No interior da glândula mamária sadia, o leite é considerado estéril, mas durante a fase de produção, há diversos pontos críticos que, quando não controlados, podem comprometer a qualidade do produto pela incorporação de microorganismos neste alimento (SILVA, P., 2010).

Depois da criação da Instrução Normativa 51, a expectativa dos envolvidos na produção leiteira é de que a qualidade do leite no Brasil evolua. Porém, mesmo com os regulamentos técnicos em vigor, os leites crus e pasteurizados ainda apresentam problemas higiênicos sanitários, o que dificulta a competitividade do produto no exterior (COUTO, 2011). Vários trabalhos realizados com diferentes tipos de leite pasteurizado evidenciaram elevados índices de amostras fora dos padrões legais, tanto microbiológicos como físico-químicos. Estes quesitos estão diretamente relacionados, e é de extrema importância a análise destes em massa, de forma a determinar a qualidade do produto final (ZOCCHÉ et al., 2002). A contaminação microbiológica do leite cru interfere diretamente na qualidade do leite beneficiado, seja ele submetido ao processo de pasteurização ou à produção de derivados, como queijos e iogurtes (MATTOS et al., 2010; NERO, 2005; DUMALISILE et al., 2005; AAKU et al., 2004; BOOR et al., 1998).

3.4 Mastite

A inflamação da glândula mamária conhecida como mastite ou mamite, acomete muitas espécies de animais domésticos, sendo mais comum em vacas leiteiras. Esta doença ocupa o primeiro lugar entre as enfermidades que afetam a glândula mamária nesta espécie.

A mastite é causada principalmente por bactérias, que em sua maioria são agentes oportunistas que chegam à glândula mamária por via ascendente, pelo canal do teto, e eventualmente, através de lesões tanto no teto como no úbere (SANTOS; ALESSI, 2010). Contudo, o processo inflamatório pode resultar em variadas alterações de acordo com o agente etiológico envolvido, o qual também pode se manifestar na forma de fungos, micoplasmas, algas e alguns agentes virais. Em alguns casos não ocorrem alterações macroscópicas ou clínicas da glândula mamária e da secreção láctea, apesar de ocorrerem alterações histológicas no parênquima mamário e aumento das células de defesa do organismo, caracterizando a forma subclínica da doença

(NASCIMENTO; SANTOS, 2011; ZACHARY; MC GAVIN, 2013). Já na mastite clínica, as consequências do processo inflamatório resultam em alterações das características físico-químicas do leite, no aparecimento de sinais de inchaço e vermelhidão da glândula mamária e na presença de grumos, exsudado purulento e até sangue no leite (NASCIMENTO; SANTOS, 2011, p. 116; SANTOS. R.L.; ALESSE, 2010, p. 844). Dentre as bactérias que causam mastite, as mais frequentes são *Streptococcus* (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*), *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) e coliformes (*Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Proteus sp.* e *Serratia sp.*).

A mastite provocada por *S. aureus* é uma infecção que ocorre predominantemente na mastite subclínica e crônica, embora possa ser aguda e causar gangrena nos quartos mamários envolvidos. Esta espécie bacteriana tende a induzir resposta imune mais branda. Sinais ou sintomas podem passar despercebidos macroscopicamente, sem apresentar alterações físicas do leite e úbere do animal (NASCIMENTO; SANTOS, 2011; ZACHARY; MC GAVIN, 2013).

A infecção da glândula mamária constitui uma das causas que provocam maior impacto negativo sobre a qualidade e quantidade do leite, resultando no aumento de células somáticas (CCS) que é representada por células brancas e células epiteliais presentes no leite (PHILPOT; NICKERSON, 1991; HARMON, 1998). As células brancas são células de defesa, indicando que houve a ativação do sistema imune (MULLER, 2002; HARTMANN et al., 2009). As células epiteliais são originadas do processo de descamação normal do tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária e compreendem de 2% a 25% do total de células encontradas durante uma infecção da glândula mamária. Nesse contexto, Harmon (2001) afirma que considerando a vaca ou o quarto mamário, a CCS normal, geralmente, está abaixo de 200.000 céls /mL, mas pode ser menor do que 100.000 céls /mL em vacas de primeira lactação. Altos valores de CCS no leite representam perdas expressivas na produção devido à formação de tecido cicatricial na região alveolar, em substituição ao processo de descamação do epitélio secretor da glândula mamária. Essas perdas podem ser de até 45% da produção de toda uma lactação, representando em média, diminuição de cerca de 900 kg de leite por animal em lactação (HAND et al., 2012). Vacas com mastite subclínica produzem

8% menos de leite já em sua primeira lactação, o que afeta a lactação subsequente mesmo com a cura da infecção (DAIRYNZ, 2008).

3.5 Incidências de *Staphylococcus aureus* na mastite subclínica

Ainda que existam bactérias que são patógenos específicos da glândula mamária, como *Streptococcus agalactiae*, que tem a glândula como seu único habitat, a maioria dos agentes causadores da mastite é oportunista. Embora inúmeros sejam os agentes causadores do processo infeccioso, os mais relevantes são as bactérias gram-positivas, causando desde mastite subclínica a uma mastite gangrenosa (BRABES et al., 1999; SANTOS; ALESSI, 2010). As bactérias do gênero *Staphylococcus sp.* são os principais agentes etiológicos que acarretam em infecções de extensa duração, podendo levar a infecções crônicas, apresentando baixa taxa de cura, com grande perda da produção de leite, sendo principalmente causadas por *S. aureus* (SABOUR et al., 2004). Em levantamentos epidemiológicos, verificou-se que *S. aureus* está presente em 50% das infecções que atingem a glândula mamária de vacas leiteira (BRABES et al., 1999). Além disso, é interessante destacar que uma grande proporção de isolados de *S. aureus* são suscetíveis *in vitro*, mas a experiência clínica com o tratamento é muitas vezes frustrante (RUEGG, 2011), devido aos mecanismos de patogenicidade e estratégias de sobrevivência dessa espécie no organismo hospedeiro.

Alguns estudos que relacionamos impactos econômicos da mastite causada por *S. aureus* com a cadeia produtiva de leite sugere em que esta é responsável não somente por perdas na diminuição da produtividade do animal afetado, mas também pela redução da qualidade do leite em decorrência dos problemas causados ao animal (SHIetal., 2010).

Os métodos de diagnóstico da mastite subclínica incluem exames microbiológicos, métodos químicos indiretos e os valores de CCS do leite dos quartos mamários individuais. Dentre os testes para diagnóstico da mastite subclínica, os mais utilizados atualmente são o *California Mastitis Test* (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS):

Diagnóstico Indireto – California Mastitis Test (CMT): O CMT é um teste indireto desenvolvido por Schalm e Noorlander, em 1957, baseado na observação visual do leite após este ser misturado ao reagente (púrpura de bromocresol- detergente que rompe a parede celular e libera o DNA das células somáticas). A reação ocorre entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite,

formando um gel, cuja concentração é ajustada ao número de células somáticas. O resultado do CMT é analisado como negativo, suspeito, fracamente positivo, positivo e fortemente positivo. É um teste que apresenta boa sensibilidade, além da facilidade de ser realizado ao “pé da vaca”, momento antes da ordenha.

Contagem eletrônica de células somáticas: A contagem de células somáticas (CCS) do leite pode ser realizada em equipamentos automatizados e é um excelente indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite. A CCS diagnosticada eletronicamente é realizada principalmente por citometria de fluxo. Esse método tem como vantagem a automatização, rapidez, precisão dos resultados e a possibilidade de conservação das amostras à temperatura ambiente. Neste método, a ação humana não tem interferência sobre os resultados obtidos (HARMON, 2001). Os contadores automáticos mais utilizados são o Somacount e o Fossomatic (ANDRADE et al., 2000).

Exame microbiológico para identificação de bactéria: Neste exame, as amostras de leite são homogeneizadas e posteriormente semeada sem ágar-sangue e incubados a 37°C. Após o período de incubação, o crescimento bacteriano é avaliado, podendo-se realizar a prova bioquímica da catalase para a diferenciação entre estafilococos e estreptococos (SCHALM et al., 1971).

Contagem bacteriana total (CBT): Neste exame, um conservante Azidiol® (BS Pharma, Belo Horizonte) é adicionado às amostras de leite destinadas à contagem bacteriana total. As análises são realizadas em um prazo não superior a 24 horas após a coleta no equipamento Bactocount – IBC, que consiste em um equipamento totalmente automatizado que utiliza citometria de fluxo para contagem de bactérias no leite cru (BENTLEY INSTRUMENTS INC) (BENTLEY INSTRUMENTS, 1997).

3.6 Contagem de Células Somáticas - CCS

A mastite é a infecção que mais acarreta no aumento da Células somáticas – CCS no leite. Quando um organismo adentra a glândula mamária, os mecanismos de defesa da vaca são mobilizados e enviam grande número de células brancas (leucócitos) para a glândula, na tentativa de combater a infecção. Se o microrganismo é eliminado, a contagem de células retorna aos níveis normais. Entretanto, se os leucócitos não tiverem êxito para eliminar o agente causador, a infecção

pode tornar-se crônica, e continuamente essas células de defesa são eliminadas no leite, levando a altas contagens de células somáticas (SANTOS; FONSECA, 2006). Além disso, outros fatores podem ter efeito indireto sobre a CCS, como a época do ano, o estágio de lactação e a idade da vaca. São observados aumentos de CCS à medida que a idade da vaca e o estágio de lactação avançam, em função de maior resposta celular de vacas adultas, aumento da prevalência de infecções e lesões residuais de infecções anteriores. Observa-se grande elevação da CCS após o parto e os níveis normais somente retornam cerca de 8 a 14 dias depois. Pode ser observado também aumento da CCS antes da secagem, quando a produção de leite cai abaixo de 4 kg/dia. Entretanto, tanto a idade como o estágio de lactação não alteram a CCS em vacas não-infectadas, uma vez que o aumento da CCS observado no final da lactação está associado à maior probabilidade de o animal ter se infectado ao longo da lactação e na medida em que fica mais velho (CUNHA et al., 2008).

3.7 Terapia antimicrobiana e resíduos em alimentos de origem animal

A terapia antimicrobiana é um dos métodos mais utilizados no controle de infecções intramamária em vacas leiteiras (ERSKINE et al., 2013). A Terapia da Vaca Seca – TVS e a utilização de antimicrobianos sistêmicos são os principais meios utilizados no controle da mastite. O tratamento no fim da lactação tem sido o mais utilizado (BRADLEY; GREEN, 2001, 2004). Os principais antimicrobianos para o tratamento da mastite causada sobretudo por *Staphylococcus* são as penicilinas, estreptomicina, cefalosporina e tetraciclina (OLIVER; MURINDA, 2012; LUTHJE; SCHWARZ, 2007). No Brasil, o grupo dos β -lactâmicos (representados pelas penicilinas e cefalosporinas) é o mais difundido entre os antimicrobianos empregados no tratamento de infecções em vacas leiteiras na região Sul do País, representando 38,22% do total de antibióticos, seguido dos aminoglicosídeos (25,19%), tetraciclinas (15,41%), macrolídeos (7,59%) e cefalosporinas (4,19%) (NETTO et al., 2005).

Segundo o National Mastitis Council Research Committee Report (2004), o tratamento dos casos de mastite bovina é a causa mais comum da presença de resíduos antimicrobianos no leite, os quais podem induzir à resistência bacteriana (MACKINTOSH, 2015). Os resíduos podem ser detectados no leite após sua administração intramamária, intramuscular, intrauterina, oral ou subcutânea, tendo como principal fonte de resíduo, o tratamento intramamário (BRITO

MAVP et al., 2001). Neto et al. (2015), encontraram resíduos no leite de vacas e novilhas após a TVS em 3,44% dos animais tratados com cloxacilina, em 12,50% dos tratados com espiramicina associada à neomicina e em 10% dos animais que receberam cloridrato de ceftiofur. A persistência de resíduos antimicrobianos após 65 dias foi também encontrada em 28,3% das vacas tratadas no período seco com um antibiótico aminoglicosídeo (gentamicina) (RAIA JR, 2001). De acordo com Costa et al. (2000), é prática o descarte do leite apenas do quarto tratado. Entretanto, devido à circulação sanguínea e à comunicação entre as glândulas, a presença de resíduos já foi detectada também nos quartos não tratados de animais submetidos à terapia por via intramamária, contaminando todo o leite produzido pelo animal.

A terapia da vaca seca é o tratamento preventivo para mastite subclínica indicado internacionalmente. Este tratamento tem sido também analisado como possível fonte de resíduo de antimicrobiano no leite, mesmo em primíparas (COSTA et al., 2004). Tronco (2003) alerta para o fato de que 30 a 80% dos antimicrobianos aplicados por via intramamária passam dos tetos para a corrente sanguínea, permanecendo por longo período. Preparações aquosas persistem geralmente por três dias; enquanto as oleosas são eliminadas após cinco dias ou mais.

Alguns fatores podem afetar a taxa de excreção de resíduos de antimicrobianos no leite, tais como a quantidade de leite produzido pelo animal, o intervalo de tempo entre o tratamento e a ordenha, os tipos de antibióticos, os veículos utilizados, as vias de administração e as doses administradas (COSTA et al., 1999; RAIA Jr, 2006). Além disso, a informação do fabricante do medicamento quanto ao período de carência, algumas vezes não é suficiente para garantir um leite livre de resíduos antimicrobianos (RAIA, 2001). De acordo com McEwen et al. (2002), em propriedades com grande número de animais, o uso de antimicrobianos é realizado em massa, mesmo nos casos em que os animais não estão doentes. Nestes casos, o antimicrobiano é adicionado na água de bebida ou no alimento dos animais.

Os índices de contaminação do leite por resíduos são muito variáveis. Sulfamerazina e ciprofloxacina foram detectados em 1,4% de amostras de leite comercializado na Coreia (CHUNG et al., 2009) e penicilinas e cefalosporinas em 1,7% de amostras de leite na Espanha (YAMAKI et al., 2004). Índices bem superiores, cerca de 40,8%, foram

detectados em amostras de leite provenientes do Irã (MOHAMADI et al., 2010).

No Brasil, resíduos de antimicrobianos foram detectados em 11,4% das amostras de leite provenientes de quatro regiões leiteiras (NERO et al., 2007). No leite pasteurizado e comercializado no Estado de Goiás foi também encontrado 9,95% de amostras contaminadas (BORGES et al., 2000). Índice bastante superior (33,3%) foi encontrado em amostras de leite coletadas na região do Triângulo Mineiro (TETZSER et al., 2005) e no Estado do Paraná 41,3% (HSIEH et al., 2009). Em Santa Catarina, um estudo realizado por Souza (1998) 50% das amostras de leite comercial analisadas foram positivas para resíduos, 44% suspeitas e somente 5% negativas. De acordo com Honorato (2011), índices de contaminações do leite dessa proporção fazem com que o mercado consumidor busque produtos mais saudáveis e seguros.

Por diversas razões, há uma grande preocupação com relação aos problemas acarretados por resíduos de antimicrobianos no leite. Para a indústria, tem-se a inibição de culturas lácteas sensíveis utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados. O processo de pasteurização tem pouco ou nenhum efeito sobre a neutralização desses resíduos no leite (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

3.8 Resistência bacteriana e seu efeito na saúde pública

A resistência microbiana é um termo usado para definir a capacidade de os microrganismos apresentarem resistência à presença de níveis terapêuticos de antimicrobianos durante o tratamento de alguma infecção (SPINOSA; CORNIAK; BERNARD, 2002; GUARDABASSE; COURVALIN, 2006). Quando alguma população de bactérias adquire resistência aos antimicrobianos, esta passa a ocupar o nicho deixado pela população de bactérias sensíveis, tornando-se dominante entre as espécies presentes, acarretando em um desequilíbrio (SPINOSA; CORNIAK; BERNARD, 2002; PRESCOTT, 2000).

O surgimento das primeiras evidências de resistência bacteriana, tanto na medicina humana quanto na veterinária, foi observado na década de 40 (CLARKE, 2006). Posteriormente, ao longo dos últimos cinquenta anos, diversos outros registros descreveram a suscetibilidade antimicrobiana de agentes etiológicos causadores da mastite bovina de populações selecionadas (BARLOW, 2011). A resistência de micro-organismos aos antimicrobianos tem acarretado em infecções que não respondem mais aos tratamentos convencionais (WHO, 2012). De acordo com o Fórum Econômico Mundial, em seu

relatório anual de 2013 sobre riscos globais, “o maior risco à saúde humana vem na forma de bactérias resistentes aos antimicrobianos” (MACKINTOSH, 2015).

A resistência de micro-organismos aos antimicrobianos pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. Um exemplo da resistência intrínseca é o caso de bactérias Gram-negativas, que, por possuírem uma camada externa de lipopolissacarídeos, são impermeáveis a alguns antimicrobianos (SPINOSA; CORNIAK; BERNARD, 2002). Os mesmos autores afirmam que a forma mais preocupante de resistência é a adquirida, que pode se originar por diferentes mecanismos, como por transformação, multiplicação de bactérias, transferência de DNA de uma bactéria para outra, mutação e seleção natural.

A resistência bacteriana em humanos, ao menos em parte, tem relação com os antimicrobianos usados nos animais de produção (MACHINTOSH, 2015). Bactérias resistentes aos antimicrobianos presentes no animal podem ser transferidas ao humano através do seu consumo (BARLOW, 2011). O possível aparecimento de resistência bacteriana na microflora do Trato Gástrico Intestinal (TGI) de humanos, por exemplo, tem sido associado ao consumo de alimentos de origem animal com resíduos de antimicrobianos na carne e leite, bem como de seus derivados. A microflora do trato digestivo humano, quando exposta a doses terapêuticas de antimicrobianos administrados por tempo prolongado, pode sofrer perturbação levando a um desequilíbrio do TGI (DENOBILE; NASCIMENTO, 2004; FONSECA; SANTOS, 2007; MANSUR et al., 2003). Cabe ainda destacar que a utilização de antimicrobianos pertencentes à mesma classe de medicamentos utilizada na pecuária e consumida pelo homem pode limitar o efeito do mesmo contra infecções que afetam os humanos.

Outro problema de saúde pública relacionado à presença de resíduos de medicamentos nos alimentos é devido à possibilidade de aparecimento de reações alérgicas ou tóxicas nos indivíduos (BRITO, 2000; DAYAN, 1993). As reações alérgicas podem se manifestar como urticárias, dermatites, rinites e asma brônquica. Estas estão quase sempre relacionadas com o uso de penicilinas em animais de produção, embora outras classes de medicamentos também possam desencadear os mesmos sintomas clínicos em humanos.

Tal cenário torna-se ainda mais grave quando se constata que mais de 25% do leite produzido no Brasil não é industrializado em estabelecimentos sob qualquer tipo de fiscalização oficial, constituindo um mercado informal, aonde o leite é consumido sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial (EMBRAPA, 2010).

3.9 Própolis

Diante da necessidade do consumo de alimentos saudáveis, sem resíduos de antimicrobianos e que sejam seguro para a saúde pública, a busca por compostos naturais com ação terapêutica e que não causem efeitos adversos ao meio ambiente e nos produtos de origem animal tem sido justificada.

Neste sentido, a própolis de *Apis mellifera L.* (*Hymenoptera, Apidae*) é um produto apícola elaborado a partir de exsudatos de resinas que as abelhas recolhem de determinadas espécies da flora local para vedar a colméia, servindo de proteção contra o vento, a chuva e a entrada de micro-organismos. Além do efeito da composição botânica da flora local, é importante destacar que os exsudatos recolhidos pelas abelhas são transformados pela ação das enzimas contidas na saliva das mesmas (BANKOVA, 2005; VARGAS et al., 2004; SILVA et al., 2006).

Na medicina humana e veterinária, a própolis tem sido utilizada com frequência devido ao reconhecimento das suas diversas atividades biológicas (PERUCHE et al., 2001; FERNANDES et al., 2006). No entanto, a sua composição química é complexa, podendo diferir suas propriedades em função da localização geográfica, origem botânica, época e clima em que as abelhas realizam a coleta dos exsudatos presentes na flora (WOLLENWEBER; BUCHMAM, 1997; PARK et al., 2002; KUMAZAWA et al., 2004). Mais de 200 substâncias químicas já foram descobertas em diferentes tipos de própolis, com destaque aos ácidos fenólicos, flavonóides, terpenos, naftaleno, aldeídos, álcoois, ácidos alifáticos, ésteres, aminoácidos, esteróides, açúcares e lignanas. Um grupo de metabólitos secundários de grande interesse, associado a diversas atividades biológicas da própolis, é o dos flavonóides (flavonas, flavonóis, flavononas) (PARK et al., 2002(a), 2002(b); EL HADY; HEGAZI, 2002; BONVEHÍ; COLL, 1994; KARTAL et al., 2002; AGA et al., 1994; BANKOVA et al., 2002; MARCUCCI et al., 2000).

Considerando as variações da própolis em decorrência de vários fatores locais e ambientais, no Brasil, pela grande biodiversidade e

clima tropical ou subtropical, variados tipos de própolis, com atividades farmacológicas diferentes já foram descritas (BANKOVA, 2005).

As principais atividades atribuídas às própolis são antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2005; FIORDALISI et al., 2016), antioxidante, imunoestimulante, hepatoprotetora (BANSKOTA et al., 1998(a), 2000(b); BORRELLI et al., 2002; EL-KHATIB et al., 2002), anti-inflamatória (DOBROWOLSKI, et al., 1991), hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (PARK et al., 2002(a), antifúngica (MURAD et al., 2002), antiviral (AMOROS et al., 1992), antiprotozoaria (BURDOCK, 1998), anticariogênica (KOO et al., 1999) e foto inibidora (STANGACIU, 1998). Além das atividades citadas, é importante considerar possíveis efeitos tóxicos da própolis como sobre a viabilidade de células saudáveis (GARCIA et al., 2004, FIORDALISI et al., 2016).

Em relação à atividade antimicrobiana da própolis, diversos trabalhos já descreveram seu efeito sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e negativas (BIANCHINI; BEDENDO, 1998; OLIVEIRA et al., 2004), embora esta pareça ser mais efetiva contra as gram-positivas (ORSI et al., 2005; FIORDALISI et al., 2016). Para o tratamento da mastite bovina, o seu uso também vem sendo investigado (FIORDALISI et al., 2014; SAEKI et al., 2011; LOGUERCIO et al., 2006). Hoepers et al. (2012) verificaram que o extrato alcoólico de própolis inibiu o crescimento de *Staphylococcus* spp. de acordo com a concentração utilizada, sugerindo o seu uso para a desinfecção de tetos e como selante em vacas com mastite. Em relação ao uso intramamário, os mesmos autores observaram uma diminuição de 32% da mastite subclínica avaliada pelo teste CMT.

Já em um estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisa proponente, verificou-se *in vitro* a redução do crescimento de *S. aureus* isolados de leite mastítico em função da concentração e da origem de produção da própolis (FIORDALISI et al. 2016). Ainda neste mesmo estudo, com o objetivo de prever possíveis efeitos tóxicos da própolis sobre a glândula mamária, explantes do tecido mamário foram cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de própolis. A análise conjunta dos dois ensaios permitiu identificar entre os extratos de diferentes origens, aquele com potencial antimicrobiano associado a uma menor toxicidade. Diante desses resultados, o presente estudo foi

proposto para avaliar *in vivo* a eficácia daquela própolis como antimicrobiano intramamário em casos de mastite subclínica.

3.10 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma das áreas em grande expansão nos dias de hoje, com técnicas promissoras em diversas áreas do conhecimento. É um campo relativamente recente, com largo espaço para muitas pesquisas. Segundo a Organização Internacional de Padronização – ISO (2010), a nanotecnologia é o estudo, design, criação, síntese, manipulação e aplicação de materiais funcionais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria em nível nanométrico (1-100 nanômetros), isto é, em nível atômico e molecular, e a exploração de novos fenômenos e propriedades da matéria nesta escala. Esta área requer conhecimentos de diversas ciências e os aplica à produção de tecidos especiais, medicamentos, equipamentos eletrônicos, produtos químicos, entre outras várias possibilidades (MOURA et al, 2008).

Dentre as possibilidades, tem-se a difusão dos fármacos no organismo, que possibilitam administrar doses muito inferiores às quantidades necessárias e suficientes para tratar uma enfermidade. Estruturas complexas medindo menos de um milésimo de milímetro, onde é possível alojar internamente fármacos, são capazes de atingir exatamente o destino desejado com menor toxicidade e maior eficácia. Assim, é possível reduzir a toxicidade e aumentar a seletividade, por exemplo, através da adição de ligantes de receptores celulares específicos na superfície da partícula transportadora, melhorando a eficiência do fármaco quando comparado à forma farmacêutica convencional (DATE; NAGARSENKER, 2008). Diferentemente dos medicamentos convencionais, que precisam ser administrados em doses maiores a fim de que uma parte deles chegue ao local desejado, os nanocarreadores podem levar quantidades bem menores do princípio ativo (WONG; LIU, 2012). Além de gerar economia de princípios ativos naturais ou sintéticos, essa característica reduz os efeitos colaterais causados pelos princípios ativos. Isso ocorre porque as nanopartículas são projetadas para apresentar seletividade para um determinado alvo biológico.

Outra vantagem é que as partículas nanométricas executam uma liberação controlada do medicamento, porém contínua. Essa ação evita os picos de dosagem que ocorrem com os fármacos convencionais. Ao serem liberados continuamente, os princípios ativos mantêm níveis constantes no organismo e duradouro.

Nessa área, o Brasil possui ainda um grande potencial de crescimento, tendo como características ser fonte de princípios ativos e insumos (principalmente os de origem natural), propiciar oportunidade para o uso de novas tecnologias com intuito de aumentar produtividade e eficácia dos produtos, apresentar constante aumento do consumo e de avanços na área regulatória (SEBRAI, 2013).

Muitos ativos naturais pesquisados ultimamente são compostos instáveis, podendo sofrer reações que levam à diminuição ou perda de eficácia e até mesmo à degradação do produto. Por isso, esta proposta da nanotecnologia surge para melhorar o desempenho das atividades farmacológicas de princípios ativos, se tornando uma alternativa para aumentar a estabilidade e, ainda, permitir a liberação controlada como encapsulamento das substâncias ativas através de técnicas que envolvem a nanotecnologia. Uma classe de ativos que podem ser encapsulados são os compostos extraídos de vegetais. Os extratos vegetais são fontes promissoras de substâncias bioativas. A nanotecnologia faz com que um fármaco incorporado num sistema nanoestruturado consiga atingir doenças, como infecções e inflamações que jamais seriam atingidas, através de medicamentos convencionais (WONG; LIU, 2012).

Estudos tanto na área biomédica quanto na área veterinária, têm demonstrado grande interesse no uso de produtos naturais para a produção de nanopartículas devido às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade (MOURA et al., 2013). Tendo em vista que materiais nanoestruturados podem apresentar características mais apuradas, como melhor distribuição e maior atividade biológica contra infecções, para este tipo de formulação, a própolis tem sido estudada em algumas pesquisas por apresentar componentes farmacológicos com atividade antimicrobiana (EMBRAPA 2012, 2014; BACIC et al., 2016).

Uma pesquisa *in vitro* realizada pela EMBRAPA em 2012 com nanopartículas de própolis sobre *S. aureus* observou que o efeito antimicrobiano é maior com nanopartículas de menor diâmetro (DA SILVA et al, 2012). Outro estudo realizado em 2014 avaliou a eficiência de nanopartículas de própolis sobre o crescimento microbiano em carne bovina *in natura*, o qual apresentou grande eficácia (ALVES et al, 2014).

Alguns resultados satisfatórios foram obtidos a partir de testes *in vitro* com a utilização de nanoprópolis contra micro-organismos

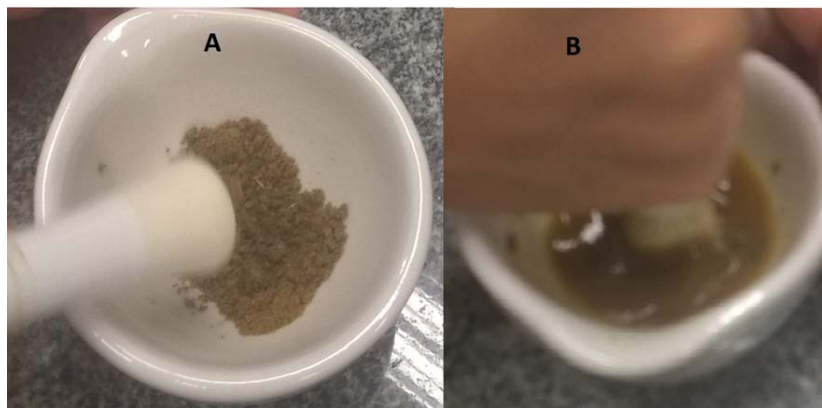
causadores da mastite subclínica, com a utilização de uma concentração de própolis com atividade antimicrobiana e uma baixa toxicidade (FIORDALISI et al, 2016; PINHEIRO MACHADO, 2017). Este presente estudo buscou avaliar *in vivo* a eficácia de nanopartículas de própolis aplicadas por via intramamária em matrizes bovinas durante o período de lactação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Própolis

As amostras de própolis bruta foram obtidas em apiários do Município de Urupema (Santa Catarina). As coletas foram realizadas ao longo de um ano de produção, de cada uma das estações do ano. Após a coleta, as amostras foram processadas para remoção de eventuais sujidades, posteriormente trituradas, acondicionadas em embalagens plásticas herméticas e armazenadas a -18°C . Para a preparação dos extratos, 20 g (peso seco) de uma amostra representativa do ano de produção (pool das amostras das diferentes estações do ano) foram novamente fragmentadas e maceradas com 200 mL de etanol 70%, os quais foram então incubados em frascos âmbar e mantidas ao abrigo da luz por 24h. Após esse período, o macerado foi filtrado a vácuo e acondicionado a -20°C por mais 24h. Os extratos foram centrifugados por 5 minutos (10.000 rpm) e o sobrenadante coletado e evaporado a 60°C .

Figura 1. Preparação dos extratos de própolis (A) antes e (B) após adição do solvente.



Fonte: Autoral.

4.2 Preparação da Nanoprópolis

As nanoprópolis foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004), conforme descrito por Pinheiro Machado, (2017c). As formulações foram preparadas no LABIMA/UFSC.

As nanoprópolis foram obtidas preparando-se uma solução orgânica homogênea composta pelo extrato seco de própolis (item 4.1), etanol P.A e surfactante lipofílico (lecitina - LIPOID S 75-3N, Alemanha) e uma solução aquosa formada por água e surfactante hidrofílico (poloxamer 188- Pluronic F 68 - BASF Chemical Company, Alemanha). A fase aquosa foi mantida sob agitação magnética moderada e aquecida a 60°C. Em outro recipiente, o etanol foi misturado à lecitina e mantido sob agitação, com aquecimento a 60°C até a completa solubilização. O extrato de própolis + etanol foi misturado e mantido sob agitação a 60°C até sua completa solubilização. Após a solubilização, a fase orgânica foi adicionada à fase aquosa gota-a-gota a fase aquosa sob agitação magnética moderada e constante. Encerrada a fase de gotejo, a suspensão se manteve em agitação magnética moderada e constante por 15 minutos. Após este período, o solvente orgânico da suspensão foi removido em evaporador rotativo (60°C) e o volume final ajustado até 10 mL. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em papel filtro.

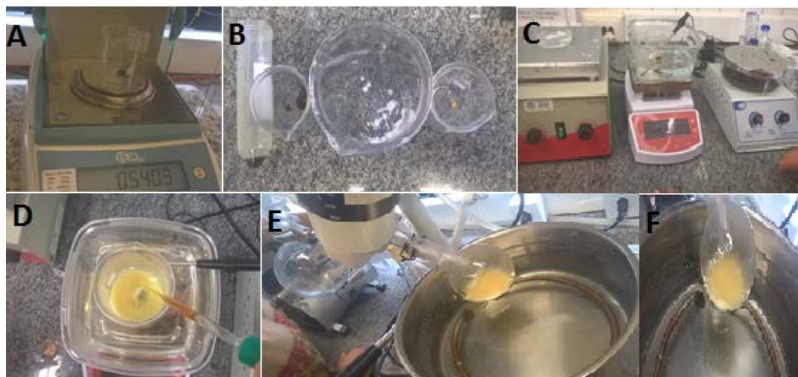
Esta formulação é a mesma descrita por Pinheiro Machado (2017), que demonstrou a estabilidade da mesma ao longo de 150 dias de armazenamento à temperatura ambiente. As características como tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, morfologia, índice de polidispersão, potencial zeta e pH estão descritas em Pinheiro Machado (2017).

Tabela 1. Formulação padrão das nanopartículas de própolis 5%.

Excipiente	Quantidade
Extrato própolis	0,5 g
Lecitina	0,025 g
Poloxamer	0,104 g
Etanol	12 ml
Água destilada	26 ml

Fonte: Autoral.

Figura 2. Pesagem do extrato (A), Lecitina e Poloxamer (B), preparação aquosa sob agitação magnética (C e D), evaporador rotativo (E, F).



Fonte: Autoral.

4.3 Seleção das Unidades de Produção para realização do experimento *in vivo*

O estudo *in vivo* foi conduzido em unidades de produção leiteira de dois projetos de assentamento da reforma agrária situado em municípios diferentes do Estado de São Paulo – Castilho e Andradina. Foram selecionadas 4 unidades de produção que apresentavam semelhanças quanto ao número de vacas em lactação e manejo sanitário. O experimento foi realizado em períodos distintos em cada unidade, com início em maio de 2017 até fevereiro de 2018, como mostrado na tabela a seguir.

Tabela 2. Período do estudo *in vivo* em cada Unidade de Produção.

Propriedade 01	Propriedade 02	Propriedade 03	Propriedade 04
13/05/2017 a 27/05/2017	27/08/2-17 a 29/10/2017	04/12/2017 a 22/01/2018	24/01/2018 a 26/02/2018

Fonte: Autoral.

Na primeira unidade de produção foi realizado um teste piloto para determinar o tempo de tratamento e a dose de nanoprópolis a ser

testada. Em cada propriedade, o protocolo de tratamento e acompanhamento da pesquisa foi aplicado pela pesquisadora veterinária.

As variáveis do rebanho e manejo de cada propriedade, incluindo número de crias, período de lactação, tipo genético dos animais, produção de leite, área total da propriedade, espécies de pastagens perenes e anuais, manejo alimentar, saúde dos animais, manejo e higiene durante a ordenha foram identificadas a partir de um questionário semiestruturado (Apêndice B) e através da observação da rotina durante o manejo dos animais.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Seleção e participação

O experimento foi realizado com quartos mamários de matrizes bovinas com diagnóstico positivo para mastite subclínica bovina. Não houve distinção quanto ao grau de sangue dos animais, considerando apenas raças mestiças. O critério de seleção do plantel da propriedade foi de que houvesse no mínimo 12 animais em lactação e que, de modo geral, estivessem dentro dos critérios básicos de seleção. Tais critérios incluíram, além de bom estado de saúde:

- 1) Matrizes com diagnóstico positivo para Mastite Subclínica; com escore CMT > 2;
- 2) matrizes clinicamente sem qualquer outro tipo de infecção;
- 3) matrizes com menos de 6 crias;
- 4) matrizes com no máximo 6 meses de lactação.

Por outro lado, foram excluídas do estudo as matrizes que já haviam iniciado qualquer tratamento terapêutico até 30 dias antes do início do estudo; ou que apresentavam algum tipo de infecção ou inflamação em qualquer parte do corpo, como ferimentos profundos, mastite clínica etc.

4.5 Estudo *in vivo*

4.5.1 Diagnóstico inicial da mastite subclínica:

Todas as vacas em lactação das unidades de produção do presente estudo foram submetidas ao California Mastitis test – CMT, totalizando 108 animais. Os animais foram distribuídos nos dois grupos GT (grupo tratado) e GNT (grupo não tratado) de acordo com a

classificação do escore resultante do teste CMT, número de crias e período de lactação. Caso dois animais apresentassem semelhanças quanto o número de tetos com mastite subclínica, período de lactação e idade, um animal recebia o tratamento intramamário e o outro animal tornou-se o controle. O grupo GNT não recebeu tratamento, nem mesmo o veículo utilizado na formulação, uma vez que este é o manejo rotineiramente empregado nas unidades de produção de leite. Além disso, considerou-se o potencial risco ao bem-estar dos animais através do agravamento do quadro com a aplicação de um produto que não continha qualquer substância com atividade antimicrobiana.

4.5.2 Número de animais e tetos

Na maioria dos países, a CCS é o método mais empregado para avaliação de mastite subclínica. Quartos mamários que apresentam $CCS > 200,000$ cels/ml, de maneira geral, são considerados portadores de mastite subclínica.

Em termos de monitoramento da mastite subclínica em cada rebanho e quartos mamários, a análise de CCS foi feita com a amostragem de cada quarto mamário antes, durante e depois do tratamento. Já com relação ao monitoramento de cada quarto mamário, foi realizada diariamente a observação aparente do mesmo antes de cada ordenha. O monitoramento do leite foi realizado através da visualização aparente com auxílio da caneca telada e realização do CMT a cada três dias pela pesquisadora.

Inicialmente, procedeu-se em uma das unidades de produção com um teste piloto (P1), com a aplicação intramamária da nanoprópolis (5 mg/mL), a cada 12 h, dos quartos mamários CMT positivos. O tratamento foi realizado por 7 dias e em intervalos regulares (3, 7 e 14 dias após o início do tratamento) procedeu-se com a coleta de leite para a análise de CCS. A coleta de leite foi também realizada antes do início do tratamento, compreendendo o que foi chamado de tempo 0 (T0).

4.5.3 Coleta e análise das amostras de leite

Cento e oito quartos mamários CMT positivo para mastite subclínica de 45 vacas saudáveis em período de lactação foram submetidos inicialmente à coleta de amostras de leite para análises de CCS (Contagem de Células Somáticas).

As amostras de leite foram coletadas de todos os quartos mamários, seguindo os seguintes procedimentos: (1) uso de luvas de

procedimento; (2) coleta antes da ordenha; (3) desprezo dos primeiros jatos de leite; (4) assepsia do orifício do teto com álcool 70%; (4) coleta de leite em tubo estéril, contendo conservantes de acordo com a orientação do Laboratório. As amostras de leite foram enviadas para análises de valores de CCS para o Laboratório Clínica do Leite em Piracicaba, São Paulo.

O teste CMT foi realizado sempre antes da ordenha da manhã e a cada 3 (três) dias durante todo o período experimental nos grupos em tratamento e controle. Após o período experimental, foram coletadas outras amostras para análises visando monitorar a eficácia do tratamento. Foram coletadas de 3 a 5 amostras de cada quarto mamário para análise de CCS com intervalos de 7 a 10 dias entre uma e outra.

4.5.4 Tratamento

No início do tratamento (dia 1) foram coletadas amostras de leite de cada quarto mamário com CMT positivo (coletado no dia (0)) acima de escore 2 para a análise de CCS. Em seguida, os animais do GT receberam, por via intramamária, 20 mL de nanoprópolis a 5 % em cada teto, a cada ordenha (cerca de 12 horas). No total, 6 (seis) aplicações com intervalos de 12 horas entre elas. A administração intramamária foi realizada através de seringas de 20 mL e sondas acopladas às mesmas, sendo todos os itens estéreis e descartáveis.

Tabela 3. Período de administração intramamária da nanoprópolis.

Dia 0	Dia 01	Dia 02	Dia 03	12 horas após
CMT	CCS Administração intramamária 12/12 horas	Administração intramamária 12/12 horas	Administração intramamária 12/12 horas	CCS

Fonte: Autoral.

Figura 3. Procedimentos de assepsia do teto com álcool (A), administração intramamária (B e C) e seringas para aplicação 20 ml (D).



Fonte: Autoral.

Durante o período experimental, o teste do CMT foi realizado a cada 3 (três) dias (1x) antes da ordenha da manhã, com o objetivo de se monitorar a evolução da mastite subclínica. Ao término do período de tratamento (12 horas após a última administração intramamária) foram coletadas novas amostras individuais de leite de cada quarto mamário para realização do teste do CMT e CCS. Cabe destacar que durante todo o tratamento, todos os animais receberam acompanhamento veterinário, sendo que nenhum animal apresentou sintomas adversos como febre, evolução para mastite clínica ou sinal de dor, rubor nos tetos ou úbere. Os intervalos de avaliação de cada uma das Unidades de Produção estão mostrados na Tabela 4. Pode-se verificar que o tempo de acompanhamento foi diferente entre elas devido a dificuldades de

deslocamento, condições climáticas (chuvas) e paralisação dos correios (dificultando o envio de amostras).

Tabela 4. Período de tratamento e tempo de monitoramento em cada Unidade de Produção.

Propriedade	Concentração nanoprópolis (mg/mL)	Número de animais	Intervalo de aplicações	Período de tratamento	Intervalos entre análises das amostras
P1	5mg/mL	17	12/12 horas	7 dias	0, 3, 7 e 14
P2	5mg/mL	10	12/12 horas	3 dias	0, 5, 15, 25 e 33
P3	5mg/mL	08	12/12 horas	3 dias	0, 2, 21, 42, 63
P4	5mg/mL	10	12/12 horas	3 dias	0, 7, 14, 35 e 49

Fonte: Autoral.

4.5.5 Avaliações de segurança

Todos os animais do presente estudo foram monitorados durante e após todo o período de aplicação da nanoprópolis. Durante o tratamento, os animais tratados foram monitorados cuidadosamente pela médica veterinária responsável, com finalidade de observar possíveis efeitos adversos que pudessem ocorrer durante o tratamento, como grumos no leite, inchaço, rubor no úbere ou quartos mamários. Qualquer evento desfavorável durante o experimento, como ferimentos ou sinais clínicos adversos, foi anotado na ficha do animal. O monitoramento dos animais após a última aplicação foi realizado a cada três dias, por um período de até 8 semanas aproximadamente.

4.6 Análise dos dados

A eficácia do tratamento dos animais com a nanoprópolis foi avaliada através da determinação da contagem da CCS no leite dos animais tratados e não tratados, determinada em quatro testes. Os dados de CCS foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas,

tendo sido testado o efeito de tratamento, do teste e interação tratamento*teste. Foi utilizado o procedimento GLM no software SAS.

O presente estudo foi realizado após ter sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (protocolo 3267201116) (ANEXO 1).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das unidades de produção

As unidades produtoras de leite foram selecionadas pelas semelhanças, principalmente quanto ao manejo alimentar, controle sanitário, manejo durante a ordenha e número de quartos mamários CMT positivo.

Tabela 5. Número de animais e quartos mamários com CMT positivo inicial maior > 2 (++).

Propriedade	Número de animais	Quartos mamários CMT +
P1	17	24
P2	10	40
P3	08	20
P4	10	24
Total	45 animais	108 tetos

Fonte: Autoral.

A atividade leiteira nas 4 unidades de produção selecionadas representava a principal matriz produtiva de geração de renda da família. A atividade era realizada de forma familiar, sendo a ordenha realizada pela esposa e marido em todas as unidades de produção. As unidades familiares tinham uma área que variava de 22 a 36 ha, com áreas destinadas a pastagens de volumosos para alimentação dos animais (Tabela 7). A dieta dos animais era semi-intensiva, sendo o pasto a base principal de fonte volumosa, com o fornecimento de concentrado no cocho durante a ordenha. Todas adotavam o sistema de pastejo rotacionado empregado pelo programa Balde Cheio da Embrapa. O período de escassez (seca) de pastagem nesta região é de 120 dias aproximadamente, variando de maio a agosto. Durante este período a dieta dos animais pode ser cana de açúcar, silagem de milho ou briquete (moagem de resíduos do algodão como o caroço) (Tabela 6). Todos os volumosos são plantados na própria unidade de produção. Apenas o concentrado e o briquete são adquiridos de fora da propriedade em estabelecimentos comerciais.

Tabela 6. Produção de volumoso para suprir a época da seca.

Propriedade	Alimentação período seca	Procedência	Área destinada
P1	Pastagem/silagem de milho/concentrado	Plantio na propriedade	Silagem: 4 há
P2	Pastagem/cana de açúcar e concentrado	Plantio na propriedade	Cana de açúcar: 3 há
P3	Pastagem/cana de açúcar/briquete	Plantio na propriedade	Cana de açúcar: 3 há
P4	Pastagem/silagem de milho/cana de açúcar	Plantio na propriedade	Silagem: 2 há Cana: 2 há

Fonte: Autoral.

Tabela 7. Espécies e ocupação de área das pastagens nas Unidades de Produção.

Propriedade	Área Total (ha)	Espécie	Área pastagem (ha)
P1	36	Mombaça, Tifton e Giggs	25
P2	28	Tanzânia e Tifton	22
P3	26	Mombaça e Tanzânia	22
P4	22	Giggs e Mombaça	18

Fonte: Autoral.

Na composição do rebanho predominavam animais mestiços, prevalecendo o cruzamento da raça Holandesa e Gir, denominado Girolando.

As instalações de produção eram simples. A ordenha era sempre realizada mecanicamente com um ou dois conjuntos com balde ao pé. Os procedimentos higiênicos durante a ordenha e após a mesma, tais como lavagem e secagem dos tetos, teste de mastite através do descarte dos primeiros jatos em uma caneca de fundo preto ou telada eram realizados antes de cada ordenha, sendo 2 (duas) por dia, o *pré-dipping*

e o pós-dipping eram feitos com a imersão dos tetos em solução a base de cloro ou iodo, antes e após a ordenha.

A produção de leite de cada matriz leiteira do estudo era em média de 16 litros/dia, como mostrado na Tabela 8.

Tabela 8. Média produção leite de cada Unidade de Produção.

Identificação propriedade	Número de vacas lactantes	Média produção de leite/mês
P1	50	16 litros
P2	22	14,5
P3	14	15
P4	18	15,8

Fonte: Autoral.

5.2 Estudo *in vivo* da eficiência da nanoprópolis no tratamento da mastite subclínica bovina

Existem poucos estudos que mostrem a eficácia *in vivo* da própolis para o tratamento da mastite subclínica durante o período de lactação. Esse trabalho é o primeiro que temos conhecimento na literatura da aplicação intramamária de nanopartículas de própolis durante o período de lactação para o tratamento da mastite subclínica. A maioria dos estudos sobre o uso da própolis ou nanoprópolis para o tratamento da mastite bovina foram realizados *in vitro*, determinando-se a atividade antimicrobiana ou os seus efeitos sobre células ou tecidos da glândula mamária bovina (PINHEIRO MACHADO, 2017; FIORDALISE et al., 2016; BACIC et al., 2016; FIORDALISE, 2014).

Apesar de terem sido analisadas amostras de 108 (cento e oito) tetos que apresentavam CMT positivo, foram submetidas às análises estatísticas apenas as amostras com CCS > 200.000 cel/ml no Tempo zero (início do tratamento). As amostras com resultados inferiores foram excluídas, uma vez que somente contagens acima desta média indicam mastite subclínica (DÜRR, 2007, CBQL). Dessa forma, a análise final ficou com 81 tetos, (n= 39 e n=42 para GT e GNT, respectivamente).

Inicialmente, procedeu-se com um ensaio piloto em uma das unidades de produção, utilizando-se um período de acompanhamento menor para avaliar a metodologia empregada, bem como a dose e o período de tratamento.

5.3 Ensaio piloto com nanoprópolis (5 mg/mL) – 7 dias de tratamento (12/12 h)

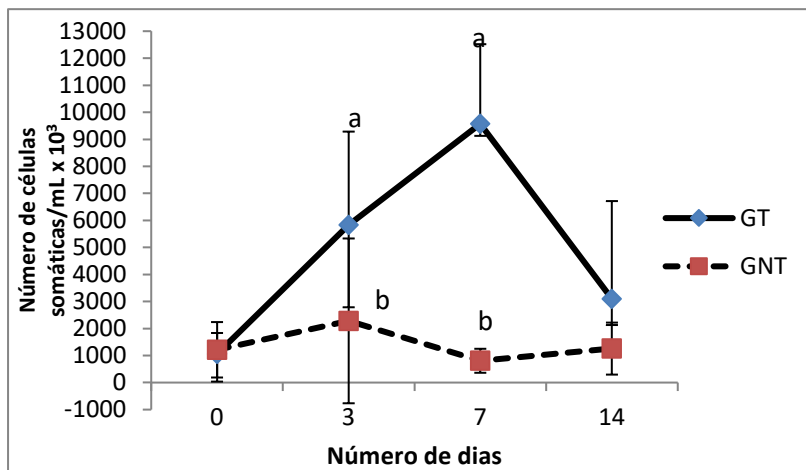
Nesta primeira unidade de produção (P1), 12 tetos fizeram parte das análises em ambos os grupos (GT e GNT). Foram realizadas 14 aplicações intramamárias de nanoprópolis durante 7 dias de tratamento. Os números de CCS antes e após o tratamento com a nanoprópolis, bem os do grupo controle, estão mostrados na figura 4. Os valores médios de CCS das amostras de leite dos quartos mamários com mastite subclínica no início do tratamento (T0) das vacas dos grupos GT e GNT não diferiram entre si (1060 células/ml e 1212 células/ml, respectivamente). No entanto, após 3 dias do início do tratamento, pode-se verificar que os valores médios de CCS no leite dos animais do GT se elevaram significativamente quando comparados aos animais do grupo controle. Esse aumento foi cerca de 550% em relação ao T0. Já no grupo GNT, embora tenha ocorrido um aumento no número de CCS, este foi bem inferior, aproximadamente 88%. Após 7 dias do início do tratamento, o número de CCS continuou a subir nos animais do GT, diferindo significativamente dos animais do grupo controle. Neste grupo (GNT) os valores médios de CCS foram inferiores ao período anterior de avaliação (tinham em média 806,1/células/ml). Portanto, de maneira geral, houve um aumento no número de CCS nos animais que receberam a nanoprópolis, durante todo o tratamento, até o seu término. Entretanto, após 7 dias do término das aplicações intramamárias (T14) verificou-se uma diminuição de cerca de 309% comparado às amostras do T7. Já nos animais do GNT houve um aumento de 56% para este mesmo período de avaliação (T14 comparado ao T7). No entanto, é importante destacar que após o término do tratamento, os valores de CCS não diferiram entre os animais do grupo que recebeu a nanoprópolis, do grupo controle. Além disso, houve um aumento de aproximadamente 190% nos valores de CCS das amostras de leite dos quartos mamários do GT antes do início do tratamento (T0) comparado ao T14. É importante destacar que o aumento na contagem de CCS no leite durante o tratamento com a nanoprópolis pode ser explicado, em parte, pelo seu efeito citotóxico às células da glândula mamária bovina (PINHEIRO MACHADO, 2017; FIORDALISI et al., 2016).

Esse mesmo extrato de própolis foi estudado por Fiordalisi et al. (2016) que verificaram que as concentrações com maior atividade antimicrobiana tinham efeito tóxico, diminuindo a viabilidade de explantes da glândula mamária (FIORDALISI et al., 2016). Portanto, no

presente estudo, o aumento da CCS pode ter sido decorrente da morte de células epiteliais provocada pela própolis.

Considerando que houve um aumento significativo da CCS nos animais que receberam a nanoprópolis durante todo o período de aplicação intramamária e que os valores não retornaram aos valores iniciais após 14 dias do início do tratamento decidiu-se reduzir o período de aplicação para 3 dias nos testes subsequentes. Além do potencial efeito tóxico da própolis, o excesso de aplicações realizadas no teste piloto pode ter acarretado, por exemplo, algum tipo de agressão, como irritação no local durante as aplicações, sugerindo a necessidade de se diminuir o tempo do tratamento para minimizar tais reações.

Figura 4. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) (N=12) durante 7 dias e não tratadas (N=12), antes do início do tratamento (0) e após 3, 7 e 14 dias do tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os animais do GT comparado aos do GNT ($P < 0,05$).



Fonte: Autoral.

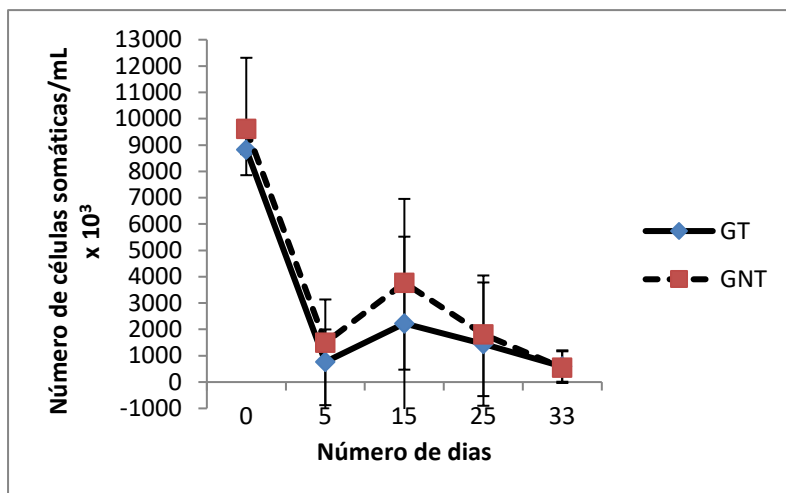
5.4 Ensaio *in vivo* com nanoprópolis (5 mg/mL) – 3 dias de tratamento (12/12 h):

O experimento *in vivo* subsequente ao teste piloto foi realizado em outras três unidades de produção. No entanto, os resultados foram

analisados separadamente para cada uma delas porque os tempos de coletas de leite para a análise do número de CCS, após o início do tratamento, foram diferentes. Da mesma forma, somente as amostras que tiveram um valor de CCS > 200.000 cel/ml foram incluídas na análise, totalizando para as três propriedades 27 tetos no GT e 30 tetos no GNT.

Os resultados encontrados na unidade de produção 2 (P2) estão mostrados na Figura 5. Antes do início do tratamento (T0), a contagem inicial da CCS era 8820 células/ml e 9620 células/ml no leite dos animais do GT e GNT, respectivamente. Neste experimento, os valores de CCS foram monitorados apenas após o término do tratamento. Neste caso, verificou-se que houve uma diminuição no valor da CCS dois dias após o término do tratamento (T5) em ambos os grupos (GT e GNT). No entanto, tais valores eram superiores a 200.000 cel/ml, indicando que os animais permaneciam com mastite subclínica. Após 15 dias do início do tratamento (T15), os valores da CCS apresentaram um novo aumento em ambos os grupos. Nas duas coletas subsequentes (T25 e T33) os valores voltaram a diminuir. Para todos os períodos avaliados não houve diferença significativa entre os animais do grupo tratado e controle (Figura 5).

Figura 5. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) durante 3 dias (n=14) e não tratadas (n=20), antes do início do tratamento (0) e após 5, 15, 25 e 33 dias do tratamento na unidade de produção 2.



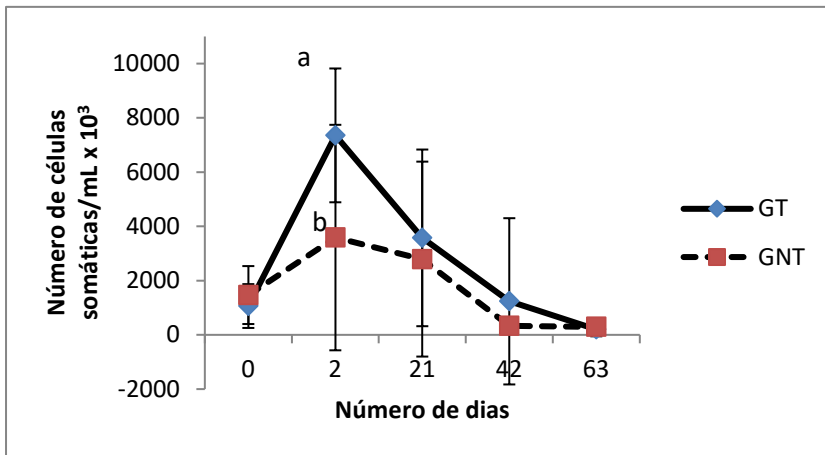
Fonte: Autoral.

Tais resultados não estão de acordo com os encontrados *in vitro* por Fiordalisi et al, 2016 e Pinheiro Machado., 2017 que encontram elevado efeito antimicrobiano contra *S. aureus* em concentrações bem inferiores a utilizada no presente estudo e citotoxicidade moderada as células do úbere bovino. No entanto, é preciso considerar *in vivo* outras variáveis, como a presença do leite no interior da glândula mamária, o qual pode dificultar a ação da própolis (Santana et al., 2013), bem como a interação do agente etiológico com o hospedeiro. O agente etiológico *S. aureus*, por exemplo, é capaz de penetrar e sobreviver nas células alveolares e nos macrófagos, além de ser capaz de formar abscessos, dificultando a ação do agente terapêutico (HÉBERT et al., 2000; ERSKINE et al., 2003).

Na Figura 6 estão mostrados os resultados encontrados no leite dos animais da terceira unidade de produção (P3). Neste teste, oito tetos fizeram parte do grupo tratado com nanoprópolis (GT) e seis como

controle (GNT). Pode-se verificar que após dois dias do início do tratamento houve um aumento significativo ($P = 0,03$) de CCS nos animais do GT em comparação ao GNT. Nos demais tempos de coleta, não houve diferença estatística entre os grupos. Ambos os grupos apresentaram uma diminuição ao longo do tratamento, apresentando aproximadamente 402% de regressão da CCS. Nos dois grupos, comparando-se o T0 com o último tempo de coleta (63 dias) os valores de CCS foram inferiores ao início do tratamento (T0). Entretanto a média do valor encontrada foi superior a 200.000 cel/ml, indicando que os animais mantiveram-se com mastite subclínica. Esta diminuição expressiva, em ambos os grupos, pode ser representada pelo maior tempo de acompanhamento da rotina durante a ordenha, o que pode ter influenciado no manejo higiênico da mesma, diferentemente dos resultados finais encontrados na P1, que teve monitoramento de 15 dias.

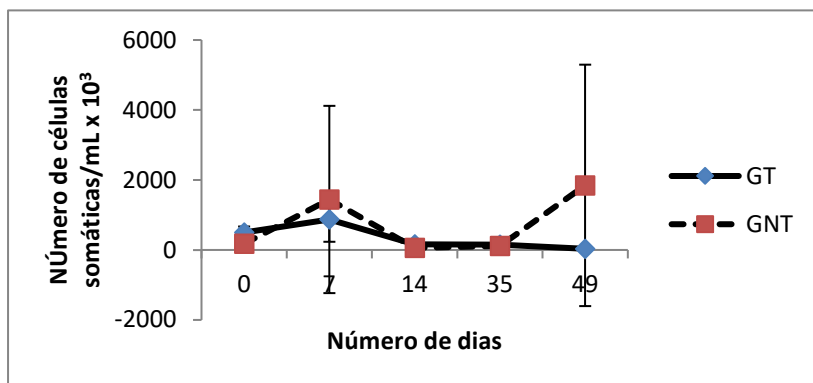
Figura 6. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) ($n=8$) durante 3 dias e não tratadas ($n=6$), antes do início do tratamento (0) e após 2, 21, 42 e 63 dias do tratamento na unidade de produção 3. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os animais do GT comparado aos do GNT ($P<0,05$).



Fonte: Autoral.

De modo similar, na quarta unidade de produção (P4) (Figura 7) os valores de CCS após 7 dias do início do tratamento foram maiores tanto no GT como no GNT. Neste teste, houve uma tendência de aumento da CCS nos animais tratados comparados aos do grupo controle ($P=0,07$). Já nos demais períodos avaliados não foram encontradas diferenças entre os grupos. Diferentemente da coleta do T0, o grupo GT teve uma contagem de CCS 49 dias após o início do tratamento abaixo dos valores indicativos da infecção. Entretanto, este resultado pode também ter sido influenciado pelo manejo higiênico durante a ordenha, levando à diminuição de novas infecções por micro-organismos nestes tetos, como observado na terceira unidade de produção que também teve um acompanhamento maior. Além disso, como somente um pequeno número de quartos mamários pôde ser avaliado nessa propriedade, a comparação entre os grupos foi prejudicada, o que pode ser demonstrado pelos desvios padrão nos períodos T7 e T49 (Figura 7).

Figura 7. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas com mastite subclínica tratadas com nanoprópolis (5mg/mL) ($n=5$) durante 3 dias e não tratadas ($n=4$) antes do início do tratamento (0) e após 7, 14, 35 e 49 dias do tratamento na unidade de produção 4.



Fonte: Autoral.

De uma maneira geral, os resultados encontrados demonstraram que ocorreu um aumento significativo de CCS/ml no leite, logo após o início do tratamento, dos animais que receberam a nanoprópolis em

todas as unidades de produção estudadas. Este fato pode sugerir que o produto na concentração utilizada pode estar ocasionando a morte das células da glândula mamária. O efeito tóxico da própolis, bem como da nanoprópolis, já foi demonstrado *in vitro* (FIORDALISI et al., 2016; PINHEIRO MACHADO, 2017). Além disso, uma possível irritação mecânica durante as aplicações pode ter ocorrido, assim como um aumento do grau da infecção através das aplicações pelo uso da sonda intramamária. Jardim (2009) também não encontrou melhora de mastite subclínica em administração por via oral e/ou externa, na forma de *dipping*, utilizando extratos de própolis. Já Bacic et al. (2016), em um outro estudo realizado *in vivo*, também verificou que o extrato de própolis a 10% por via intramamária provocava a inflamação do úbere, porém quando aplicado a 1% demonstrava atividade antimicrobiana e antioxidante sem causar danos ao tecido. De acordo com Brito & Brito, (1998) à medida que o grau de inflamação aumenta, tem-se a diminuição da síntese de leite. No entanto, no presente estudo, mesmo com o aumento da CCS durante o tratamento, não ocorreu nenhuma diminuição visível na produção de leite dos animais do GT, o que pode ser decorrente do curto tempo de monitoramento de cada tratamento e aplicação. Dessa forma, mesmo com o aumento da resposta imune por uma suposta inflamação decorrente de uma irritação pela nanoprópolis, não ocorreu agressão expressiva nas células epiteliais. É importante relatar que não foram diagnosticadas reações ou sinais visuais de resposta inflamatória durante e após o tratamento, como sinal de dor, rubor ou vermelhidão nos tetos ou úbere dos animais tratados.

No presente estudo, apesar do aumento expressivo da CCS logo após o início do tratamento, após a última aplicação de nanoprópolis intramamária na P2 (T5), P3 (T21) e P4 (T14) houve uma redução da CCS. No entanto, somente nos quartos mamários da P4 do GT é que houve uma diminuição da CCS para valores abaixo de 200.000 cel/ml. Resultados semelhantes foram encontrados por Medeiros (2001), que também encontrou que a formulação intramamária de própolis, em um primeiro momento, estimulava o aumento da resposta inflamatória dos animais tratados, possivelmente por meio de um mecanismo irritativo. Em seguida, essa resposta foi sendo reduzida, provavelmente devido à redução do nível de infecção da glândula mamária, com consequente redução ou eliminação dos principais fatores responsáveis pelo aumento do número de células, que são os micro-organismos.

Por outro lado, o fato de que em ambos os grupos de todas as propriedades do presente estudo houve uma diminuição da CCS ao

longo do tempo pode ser atribuído à uma melhoria das condições de manejo e uma melhor assepsia por parte dos produtores, provocadas pela participação na pesquisa.

De uma maneira geral, a concentração de nanoprópolis para o tratamento de mastite subclínica utilizada neste estudo não modificou a condição inicial, quando comparada ao grupo não tratado. Os valores médios da CCS das amostras de leite nas 3 propriedades (P1, P2 e P3), tanto do GT e GNT na última análise, situaram-se acima da contagem preestabelecida, ou seja, acima de 200.000 células/ml por quarto mamário. Além disso, após o tratamento, não se observaram diferenças neste valor entre os quartos mamários tratados e não tratados de todas as propriedades.

Uma nanoprópolis não alcoólicatem sido estudada pela EMBRAPA gado de leite juntamente com outras instituições. A formulação desenvolvida por eles apresentou uma eficácia superior à própolis íntegra frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* em experimentos *in vitro* (ALVES et al, 2014). Segundo esses autores, a utilização de uma formulação não alcoólica pode ser menos irritativa ao tecido mamário em comparação aos extratos alcoólicos rotineiramente utilizados em formulações intramamárias para bovinos, que geralmente determinam processos inflamatórios na glândula mamária. Tendo em vista que a nanoprópolis utilizada no presente estudo é não alcoólica e que mesmo assim houve uma suposta irritação as células epiteliais, isso pode ter sido ocasionado pela concentração utilizada, sendo efeito da própria própolis.

O uso de nanoformulações também pode ser vantajoso pelo fato de que quanto menor for o diâmetro da partícula contendo o princípio ativo como a própolis, maior é a ação sobre os microorganismos. Brandão et al. (2012), por exemplo, verificaram que o efeito bactericida *in vitro* de nanopartículas de própolis contra *Staphylococcus aureus* foi de 256 µg/mL com tamanho de 250 nn. É importante salientar que, em estudos anteriores, as suspensões de nanopartículas de própolis utilizadas no presente trabalho, mostraram elevada atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. aureus* nas concentrações de 156 e 310 µg/mL, mas mostraram-se tóxicas às células do úbere bovino a partir da concentração de 78 µg/mL (PINHEIRO MACHADO, 2017). Já o presente estudo visou dar continuidade a esses experimentos *in vitro* na busca de tecnologias associadas a princípios naturais como a própolis.

Considerando a possibilidade de tratamento da mastite subclínica em período de lactação para que a funcionalidade da glândula mamária retorne a seu estado normal de produção de leite ainda no período de lactação, é fundamental estudos mais aprofundados sobre a atuação da nanoprópolis administrada pela via intramamária. Dessa forma, o uso da nanoprópolis intramamária no controle da mastite subclínica durante a lactação e seus possíveis efeitos devem ser estudados em outras concentrações, realizando-se o isolamento do agente etiológico antes e depois do tratamento.

6. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, pode se concluir que a concentração de nanopartículas de própolis para o tratamento da mastite subclínica utilizada neste estudo não reduziu a contagem de células somáticas quando comparada ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

AFROUZAN, H; AMIRINI, C; MIRHADI, M.S.A; EBADOLLAHI, A.; VASEJI, N.; TAHMASBI, G. **Evaluation of antimicrobial activity of propolis and nanopropolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.** African Journal of Microbiology Research Vol. 6(2), pp. 421-425, 16 January, 2012 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJMR> DOI: 10.5897/AJMR11.1183.

ALMEIDA, EDSON. **Aditivos digestivos e equilibradores da microbiota intestinal para frangos de corte.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012, 48 f. Acesso em 12 de julho de 2016. Disponível em: <file:///c:/users/microsoft/downloads/aditivos%20digestivos%20e%20equilibradores%20da%20microbiota%20intestinal%20para%20frangos%20de%20corte.pdf>.

ALTIERI, M. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável.** Guaíba: Agropecuária, 2002.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Células somáticas em leite de cabra: tipos e fatores de variação. In: **Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, 2.,** 2002, Ribeirão Preto. Anais... São Paulo: Instituto Fernando Costa, p.61-69, 2002.

ANDRADE, S.F.; GIUFFRIDA, R.; RIBEIRO, M.G. Quimioterápicos, Antimicrobianos e Antibióticos. In: Andrade, S.F. (Ed.), **Manual de Terapêutica Veterinária.** Roca, São Paulo, SP, p.13-58, 2001.

ANDRADE, U.V.C.; HARTMANN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células Somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **Ars Veterinária, Jaboticabal, SP**, v.25, n.3, 2009, p. 129-135.

BACIC, G.; MACESIC, N.; RADIN L.; ALADROVIC, J.; MATANOVIC, K., et al (2016). Intramammary Propolis Formulation

for Subclinical Mastitis Prevention and Treatment in Dairy Cows. **J Dairy Vet Anim Res** 3(5), 2016.

BANKOVA, V. S. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**. vol. 2, p.29-32. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1062152/>. Accessed on August 13, 2016.

BARLOW, J. (2011). Antimicrobial Resistance and the Use of Antibiotics in the Dairy Industry: Facing Consumer Perceptions and Producer Realities. **WCDS Advances in Dairy Technology** 23: 47-58. Accessed on August 10, 2016.

BONA, T. D. M. M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L.B.; KURITZA, L.N.; VASCONCELOS S.P. & SANTIN E. 2012. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de salmonella, eimeiria e clostridium em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32(5):411-418, maio 2012, Curitiba. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v32n5/a09v32n5.pdf>. Acesso em 17 de agosto de 2016.

BORGES, G.T.; SANTANA, A.P.; MESQUITA, A.J.; MESQUITA, S.Q.P.; SILVA, L.A.F, NUNES, V.Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**. 2000;1(1):59-63.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International journal of pharmaceutics**, v. 280, n. 1, p. 241-251, 2004.

BRADLEY, A. J., et al. (2006). The use of antibiotics in the treatment of intrammary infection at drying off. 24th. **World Buiatrics Congress**; 15-19 October, 2006; Nice, France. Available in: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.562.3868&rep=rep1&type=pdf>. Accessed on August 10, 2016.

BRADLEY, A.J.; Green, M.J. An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow therapy on clinical coliform mastitis.

Journal of Dairy Science, 2001; 84(7):1632-1639. Available in: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(01\)74598-5/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(01)74598-5/pdf). Accessed on august 12, 2016.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** 2004 Nov;20(3):547-68. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471624>.

BRANDÃO, H.M., VINHOLIS, M. M. B., MOSQUEIRA, V. C. F., MATTOSO, L. H. C., BRITO, M. A. V. P., RIBEIRO, C., SOUSA, R. V., BARBOSA, N. R., LANGE, C. C. **Compositions based on propolis nanocapsules which can be used as carriers for substances of interest, methods for producing same and use thereof.** 2012, WO2012054999.

BRASIL 1999. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 007 de 17 de maio de 1999. Normas Disciplinadoras para a Produção, Tipificação, Processamento, Envase, Distribuição, Identificação e Certificação de Qualidade de Produtos Orgânicos, sejam de Origem Animal ou Vegetal.** Brasília, DF. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br/>. Agricultura orgânica. Produtos orgânicos). Acesso em 9 de março de 2016.

BRASIL 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Brasileiro de Medicina Veterinária.** In: Anais... 19-22 de outubro de 2008. Gramados-RS.

BRITO, M.A.V.P(a).; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite. In: Madalena FH, Matos LL, Holanda Jr. EJ (Org.). **Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil.** Belo Horizonte: FEPMVZ; 2001. p. 61-74.

BRITO, M.A.V.P(b).; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostra de *Staphylococcus aureus* isolados de infecção intramamária bovina.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v 53, n.5, p.531-537, 2001.

BUENO, V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; COSTA, E.O.; COELHO, K.O.; NEVES, R.B.C. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira** v. 3, n. 2, p. 47-52, jul./dez. 2002.

CARDOSO, V. L.; MONSALVES, F. M.; EL FARO, L. Valores econômicos para ocorrência de mastite clínica e contagem de células somáticas em um sistema intensivo de Produção de Leite. **42º Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Goiânia, Goiás. CD-ROM. 2005.

CHUNG, H.H.; LEE, J.B.; CHUNG, Y.H.; LEE K.G. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. **Food Chem.** 2009, v. 113(1):297-301.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P.F.; DEMETRIO, C.G.B.; RIBEIRO JÚNIOR, P.J.; MEYER, P.M.; CORASSIN, C.H.; CASSOLI, L.D. 2004. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33: 623-634.

COSTA, E.O. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Rev Napgama**. v.2, p.16-20, 1999.

COSTA, E.O. **Importância da mastite na produção leiteira do país**. Revista de Educação Continuada do CRMV-SP, São Paulo, fascículo 1, volume 1, p. 003 - 009, 1998.

COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; GUERRA, J.L.; MELVILLE, P.A. Antimicrobial susceptibility of staphylococcus ssp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Jornal of Veterinary Medicine**, v.47, n. 2, p. 99-102, 2000b. Series B.

COSTA, E.O.; RAI, R.; WATANABE, E.T.; GARINO JR, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de

mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite dos quartos sadios e tratados. **Revista Napgama**, v.3, p.14-17, 2000a.

COUTO, E. P. **Monitoramento dos principais pontos críticos de controle no beneficiamento e envase do leite em laticínios do distrito federal**. Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 47 p. 2011.

DairyNZ, (2014). **DairyNZ Annual Report 2013/2014**. Retrieved from: <http://www.dairynz.co.nz/publications/dairynz-corporate/>.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetracilina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 10, n. 2, p. 209-218, 2004. Disponível em: <http://www.rbcf.usp.br/Edicoes/Volumes/v40n2/PDF/v40n2p209-218.pdf>.

DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B.; SHAH, S.A.; NAQVI, S.A.H. e DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on própolis bee products. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, p. 77-82, 1991.

ERSKINE, R.J.; WAGNER. S.; DEGRAVES.F.J. **Mastitis therapy and pharmacology**. Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice, v.19, n.1, p.109, 2003.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul-ago, 2004.

FERNANDES, Júnior. A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**. 2006;36(1):294.

FERREIRA, M. A. Controle de qualidade físico-química em leite fluido. Brasília: Universidade de Brasília, 20 p. **Dossiê Técnico**. 2007.

FIORDALISI, SAMIRA A.L. ; HONORATO, LUCIANA A. ; LOIKO, MÁRCIA R. ; AVANCINI, CÉSAR A.M. ; VELEIRINHO, MARIA B.R. ; FILHO, LUIZ C.P. MACHADO ; Kuhnen, Shirley . The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 2308-2318, 2016.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Estratégias para Controle de Mastites e Melhoria da Qualidade do Leite – Barueri, SP**: Manole; Pirassununga, SP: Ed. dos Autores, 2007. Barueri: Editora Manole, 2007, v.1. p.314.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FONTERRA (2013). **Rinsing Programme update**. Available in: <http://dcv.nzva.org.nz/sites/default/files/domain5/Rinsing%20Programme%20Update%20November.pdf>.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO, Junior. J.W.; STAMFORD, T.L.M.; REBELO, A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA, Filho. V.M.; SANTOS, F.G.B.; DE SENA, M.J.; MOTA R.A. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto de Biologia.**, v. 72, n.2, p.171-177, 2005.

GARCIA, R.C.; PINHEIRO DE SÁ, M.E.; LANGONI, H.; FUNARI, S.R.C. 2004. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhos jovens. **Acta Scientiarum Animal Sciences.**, v. 26, p. 57-67.

GHISALBERTI, E.L. 1979. Propolis: a review. **Bee World**, 60: 59-84.
GLIESSMAN, Stephen. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 2 ed. Porto Alegre: ED. UFRGS, 2001.

GREEN, M.; BRADLEY, A. (2004). **Clinical Forum - *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle**. Uk vet: 9 (4). Retrieved from: <http://www.ovg.co.uk/Staph%20aureus%20mastitis%20in%20cattle.pdf>.

GUARDABASSI, L.; PRESCOTT, J. F. (2015). Antimicrobial Stewardship in Small Animal Veterinary Practice: From Theory to Practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.**, v. 45, n. 2, p. 361-376.

HAND, K. J.; GODKIN, A.; KELTO, D. F.; Milk production and somatic cell counts: a cow-level analysis. **Journal of Dairy Science**, vol. 95, p. 1358–1362, 2012.

HARMON, R.J. Somatic cell counts: a primer. **In: Annual meeting national mastitis council.** Reno. Proceedings... Madison: National Mastitis Council, 2001. p.3-9.

HARTMANN, W. **Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *listeria monocytogenes*.** Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

HÉBERT, A., K. SAYASITH, S. SÉNÉCHAL, P. DUBREUIL, and J. Lagacé. 2000. **Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk.** FEMS Microbiol Lett. 193: 57-62.

HECHT, S. B. A. evolução do pensamento agroecológico. In: ALTIERI, Miguel. **Agroecologia: uma perspectiva agroecológica. Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.**, Porto Alegre, v2, n,2, abr./jun. 2001.

HOEPERS, C.A.; SILVA, B.T.; MARCUSSO, P.F.; COSENZA, G.R.; PORTO, E.P.; MATSUMOTO, L.S.; PEIXOTO, E.C.T.M. **Utilização de própolis no controle da mastite bovina: Desinfecção e selante de tetos.**

HSIEH, S.H.; HUANG, H.Y.; LEE, S. Determination of eight penicillin antibiotics in pharmaceuticals, milk and porcine tissues by nano-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.**

ISO [International Organization for Standardization]. ISO/DTS 80004- Nanotechnologies-Vocabulary- Part I: Core Terms. 2010, 16p.

JULIANO, R. S.; TOMICH, R.G.P.; CAMPOLIN, A.I.; PELLEGRIN, A.O; SILVA, R.A.M.S. **Produção de leite em assentamentos do município de Corumbá-MS**. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2007. 3p. ADM – Artigo de Divulgação na Mídia, n.118. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM118>>. Acesso em: 26 jul. 2016.

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

LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N. M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A. C. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa agropecuária brasileira.**, Brasília, v.41, n.2, p.347-349, fev. 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**.2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Molecular bases of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program Bft – Germ Vet, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29,n.5,p.528-535,2007.

MACHADO, G. T. B. P. ; VELEIRINHO, M. B. R. ; MAZZARINO, L. ; PICCININ, I. N. ; MACHADO FILHO, L. C. P. ; KUHNEN, S. . Atividade antimicrobiana de nanopartículas de própolis contra staphylococcus aureus visando o seu uso no tratamento da mastite bovina. In: **XII Congresso Internacional de Zootecnia**, 2017, Santos. anais zootec 2017, 2017.

MACKINTOSH, BVSc. (2015.). **Antibiotics and Dry Cow Therapy: What's the Problem?**. Kellogg Rural Leaders Programme, June. 2015.

MAGALHÃES, H.R.; FARO, L.; CARDOSO, V.L.; PAZ, C.C. P.; CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na

produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia** 2006, v.35, n.2, p.415-421. Disponível em: www.sbz.org.br R. Bras. Zootec.

MARQUES, R. H.; GRAVENA, R. A.; SILVA, J. D. T.; HADA, F. H.; SILVA, V. K.; MUNARI, D. P.; MORAES, V. M. B. Inclusão da camomila no desempenho, comportamento e estresse em codornas durante a fase de recria. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p. 415-420, 2010.

MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA, FILHO. E.S. 2010. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiaba, MT. **Ciências Animal Brasileira**. v.11, n., p. 181-187.

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

McEwen, S. A., Fedorka-Cray, P.J. 2016. **Antimicrobial Use and Resistance in Animals**. CID 2002:34 (Suppl 3). S93. Downloaded from <http://cid.oxfordjournals.org/> by guest on August 15, 2016.

MENEZES, Hermis. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo do Instituto Biológico**., São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, jul./set., 2005.

MOHAMADI, Sani A., NIKPOOYAN, H., MOSHIRI, R. Aflatoxin M1 contamination and antibiotic residue in milk in Khorasan province, Iran. **Food and Chemical Toxicology**. 2010;48(8-9):2130-2.

MORGAN, René. **Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais**. 4 vol. Editora: Hemus. Ano: 1979.

MOURA, L.P.P. et al. Effect of hydroalcoholic propolis solution and robenidin on the oocysts per gram of drops scores of *Eimeria* spp. in New

Zealand white rabbits. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.27, n.2, p.325–330, 1998.

MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. **Colloid Inferf. Sci.** 2008, 321, 477.

MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; ZUCOLOTTO, V. - J. **Nanosci. Nanotechnol.**, 13, p.1946, 2013.

MÜLLER, E.E. **Profílexia e controle da mastite**. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Maringá. **Anais...** Maringá: 2000. p.10-13.

MÜLLER, E.E. **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite**. In: Sul-leite: Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: 2002. p.206-217.

MURAKAMI, F.Y. **Utilização do extrato alcoólico de própolis na mastite bovina**. 2007. Marechal Cândido Rondon, 23f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) Graduação em Zootecnia – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Rev. CFMV**, ano XVII(53):61-67.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V., CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição.**, Campinas, v.14, ed.2, p. 119-124, maio/ago., 2001.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4 ed. Verona: NMC, 2004. p. 47.

NERO, L. A.; MATOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de Antibióticos em leite Cru de quatro regiões leiteiras do Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

NETO, A.E.; JUNIOR, F.G.; SANTOS, J.C.A.; SILVA, L.C.A.; MATOS, R.A.T. Avaliação de resíduo de antibiótico em amostras de leite de vacas após a terapia de vacas secas. **Arquivos do Instituto Biológico.**, São Paulo, v.82, p. 1-4, 2015.

NETTO, D.P.; LOPES, M.O.; OLIVEIRA M.C.S.; NUNES, M.P.; MACHINSKI Junior M.; BOSQUIROLI S.L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. C.; FILHO, D. V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences.** 2005. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/.../1260/692>>.

Normativa 051. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Brasília, DF.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E.; JAYARAO, B. M. (2011). Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. **Foodborne Pathogens. Dis.** 8, 337-355.

OLIVER, S.P.; MURINDA, S.E. Antimicrobial reistence of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice Diseases**, v.28, n.2, p. 165, 2012.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FUNARI, S.R.C.; BARBOSA, L.; FERNANDES, JR. A. 2005. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animmals and Toxins including Tropical Diseases**, v.11, n.2, p. 109-116.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M. and AGUIAR, C.L. 2002(b). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, 50: 2502-2506. Publication Date (Web): March 14, 2002. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf011432b>.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. 2002(a). Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Cienc. Rural**, Ciência Rural, Santa Maria, v.32, n.6, p.997-1003, 2002. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n6/12745.pdf>.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.; CONTADO, J.L. 1995. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellífera* L. no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, p. 1253-1259.

PEREIRA LS, BOTTEON RCCM. Efeito da aplicação intramamária de própolis sobre a composição do leite e a contagem de células somáticas. **35º Conbravet – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. In: Anais...** 19-22 de outubro de 2008. Gramado-RS

PERUCHI, C.M.S.; SILVA, E.B.; ANDRADE, R.A.; FRANCO, S.L.; RAMATHO, L.T.O. Efecto del propóleo en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.**, v.19, ed.2, p. 23-34, 2001.

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

PINTO et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v.38, n.6, São Paulo, 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141395962001000600006.

PINHEIRO MACHADO, G.T.B., VELEIRINHO, M.B., MAZZARINO, L., PICCININ, I.N., PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C., KUHNEN, S. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de própolis contra *Staphylococcus aureus* visando o seu uso no tratamento da mastite bovina. **XXVII Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Santos, 2017a.

PINHEIRO MACHADO, G.T.B., VELEIRINHO, M.B., MAZZARINO, L., PICCININ, I.N., PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C., KUHNEN, S. Citotoxicidade de nanopartículas em células epiteliais da glândula mamária bovina da linhagem MAC-T. **XXVII Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Santos, 2017b.

PRESCOTT, J.F. (2000). Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walker, R. D. *et. al.*, eds. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. Iowa State University Press, 27-49.

RAIA, JR.R.B. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite**. Dissertação (Mestrado em toxicologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 87 f.

RASMUSSEN, MD.; BJERRING, M, SKJOTH, F. Visual appearance and CMT score of foremilk of individual quarters in relation to cell count of cows milked automatically. **Journal of Dairy Research**. , v. 72, ed. 1, p. 49-56, 2005.

ROYER, A. F. B.; GARCIA, R. G.; BORILLE, R.; SANTANA, M. R.; NUNES, K, C. Fitoterapia aplicada a avicultura industrial. **Enciclopédia Biosfera.**, v.9, n. 17, p. 1466-1484, 2013.

RUDDER, M. C. **Guia das Plantas Mediciniais**. São Paulo, Editora: Rideel, Ano: 2001.

RUEGG, P. **Treatment of Clinical Mastitis**. Disponível em: https://milkquality.triforce.cals.wisc.edu/wpcontent/uploads/sites/212/2011/09/treatment_of_clinical_mastitis.pdf Acesso em 25/03/2018.

RUELA, Iara. C. A et al. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciências e Tecnologia Alimentar**, Campinas, p. 139-146, janeiro-março, 2005.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3449-3455, 2004. Available in: <http://jcm.asm.org/content/42/8/3449.full>.

SAEKI, E.K.; PEIXOTO, E.C.T.M.; MATSUMOTO, L.S.; MARCUSO, P.F.; MONTEIRO, R.M. Mastite Bovina por *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.284-290, 2011.

SANTOS, M. V. **Impacto econômico da mastite, 2001**. Site Milkpoint. Disponível em <[http:// www. milk point.com .br/mn/utills /print.asp?id_artigo=128](http://www.milkpoint.com.br/mn/utills/print.asp?id_artigo=128)>.

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

SCHNAIDER, T.B.; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**., v.53, p. 278-85, 2003.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, n.1, p.69-73, 2005.

SILVA, D.P., et al. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite de células de refrigeração da região Sul do Estado do Pará – Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.16, n.4, p.359-368, 2014.

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A. A., RIBEIRO M. C.M., CUSTÓDIO A.R., ANDRADE N.E.D. e PEREIRA W.E; 2006. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**., v. 36, p.1842-1848. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n6/a27v36n6.pdf>.

SILVA, Sobrinho. A. G., et al. **Utilização da própolis no tratamento curativo da pododermite necrótica em ovinos**. Disponível em:

<<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/56/propolis.htm>>. Acesso em: 13 agosto, 2016.

SOUZA, N. G. **Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo no Estado de Santa Catarina**. 1998. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

SPINOSA, Helenice. S.; GORNIAC, L.; BERNARD, Maria. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2 ed. Editora: Guanabara Koogan - Rio de Janeiro, 2002.

TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E.C.; PERES, R.F.G. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do triângulo Mineiro, MG. **Higiene alimentar.**, v. 19, n. 130, p.69-72, 2005.

TROCARELLI, M.Z.; BRANDÃO, H.M.; GERN, J.C.; SÁ GUIMARÃES, A.; LANGINI,H. Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. **Veterinária e Zootecnia.**, ed. 20 (Edição Comemorativa), p. 124-136, 2013.

TRONCO, V.M (org.). **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2ª ed. Santa Maria: Ed. da UFSM; 2003.

VARGAS, A.C. LOGUERCIO, A.P., WITT, N.M., COSTA, M.M., SILVA, M.S., VIANA, L.R. 2004. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciência. Rural.**, v. 34, p. 159-163.

VOLPI N, B. G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry.**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.**, v.42, p. 354-361, 2006.

Wong K.K.Y. & Liu X.L. 2012. Nanomedicine: a primer for surgeons. **Pediatr. Surg. Int.** 28:943-951.

WHO. (2012). **Antimicrobial resistance fact sheet**. No 194. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en>.

WHYTE, D.; WALMSLEY, M.; LIEW, A.; CLAYCOMB, R.; MEIN, G. Chemical and rheological of gel formation in the California Mastitis Test. **Journal of Dairy Research.**, v.72, n 1, p. 115-21, 2005.

WISEMAN, P. **Lift income and reduce expenses**. Vet Notes, Totally Vets, February 2011, p. 1. Available in file:///C:/Users/Microsoft/Pictures/ARTIGOS%20INGLES/Wiseman,%202011%20veterinary-inventory-management-guide-2011.pdf.

YAMAKI M.; BERRUGA, M.I.; ALTHAUS, R.L.; MOLINA, M.P.; MOLINA, A. Occurrence of antibiotic residues in milk from Manchega ewe dairy farms. **Journal of Dairy Science.**, v. 87, n. 10, p. 3132-7, 2004.

ZACARÃO, P.C. **Estudo da propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais de alho (*Allium sativum*), pimenta do reino (*Piper nigrum*) e pimenta rosa (*Schinus molle*) para aplicação em cortes de frango temperados**. 2012. 12 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Tecnologia em Alimentos) - Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2012.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin International Dairy Federation - IDF**, v.345, p.15-18, 2000.

ANEXO 01: Certificado de Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Nanopartículas de própolis para o tratamento intramamário de mastite subclínica bovina durante o período de lactação", protocolada sob o CEUA nº 3267201116, sob a responsabilidade de **Shirley Kuhnen e equipe; Luciana Aparecida Honorato; Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho; Cristiane da Silva de Souza Corrêa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 19/12/2016.

We certify that the proposal "Nanoparticles of propolis for the intramammary treatment of bovine subclinical mastitis during the lactation", utilizing 100 Bovines (100 females), protocol number CEUA 3267201116, under the responsibility of **Shirley Kuhnen and team; Luciana Aparecida Honorato; Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho; Cristiane da Silva de Souza Corrêa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/19/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 12/2016 a 03/2018

Área: Zootecnia E Desenvolvimento Rural

Origem: Não aplicável

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: 2 a 10 anos

N: 100

Linhagem: Misto

Peso: 250 a 550 kg

Resumo: Dentre os principais problemas da cadeia produtiva do leite, estão os sanitários, com destaque para a mastite. Esta é responsável por causar grande impacto tanto na qualidade como na quantidade de leite produzido pelo animal. A mastite é resultado de um processo inflamatório da glândula mamária, geralmente proveniente de origem infecciosa, causada principalmente por bactérias. O controle da mastite no rebanho é complexo por suas diversas origens e agentes etiológicos responsáveis pela infecção. Vários são os tratamentos empregados para o seu controle. O uso de antimicrobianos sintéticos, tanto sistêmicos como locais, são os mais frequentes, porém, os mesmos têm sido utilizados sem controle, tanto na dosagem, quanto na carência empregada pelo fabricante. O uso indiscriminado de tais produtos pode ter como consequência a transferência dos mesmos ao consumidor através do leite, o que tem se tomado um problema de saúde pública. Além disso, são vários os registros que tem mostrado que com o uso indiscriminado desses produtos tem ocorrido o aparecimento de resistência dos agentes etiológicos. Em contraponto a este cenário, há uma preocupação crescente de parte da população em adquirir alimentos de qualidade e livre de resíduos químicos, justificando-se a busca por métodos alternativos para o controle sanitário dos animais, com destaque aos produtos naturais. Dentre eles, a própolis é reconhecida por sua diversidade de princípios ativos, responsáveis por diferentes atividades, incluindo antimicrobiana, antitumoral, antiviral, anestésica, cicatrizante e anti-inflamatória. Na bovinocultura leiteira, muitos trabalhos tem mostrado o efeito antimicrobiano da própolis contra bactérias isoladas de leite mastítico, porém ainda são poucos os trabalhos científicos que avaliaram in vivo a eficácia da administração intramamária dos extratos de própolis. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar o uso de nanopartículas de própolis, do Planalto de Santa Catarina, para o tratamento intramamário da mastite subclínica, em matrizes bovinas em período de lactação. Este projeto dará continuidade aos estudos iniciados em 2013, onde foi possível identificar entre extratos de própolis de diferentes origens de Santa Catarina, utilizando testes in vitro, aquele com um bom potencial antimicrobiano e menor toxicidade aos explantes da glândula mamária bovina. O estudo prosseguiu com o desenvolvimento de uma formulação contendo nanopartículas do extrato de própolis previamente selecionado, permitindo assim o estudo da sua eficácia no tratamento intramamário, objeto da presente proposta. Para isso, vacas em lactação com mastite subclínica, diagnosticadas pelo teste CMT, receberam uma formulação líquida contendo nanopartículas de própolis (1mg/mL), em intervalos de 12 horas (antes de cada ordenha) (cerca de 12 horas). O período de tratamento será definido em um teste piloto, não devendo ultrapassar 5 a 7 dias. O acompanhamento do tratamento será feito, através da realização diária do teste de CMT e a eficácia do produto será avaliada comparando-se o valor de CCS e CBT do leite coletado antes e após o tratamento. Espera-se com os resultados obtidos, contribuir para a redução de resíduos no leite bem como subsidiar uma produção diferenciada como o leite orgânico ou agroecológico.



Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 21 de dezembro de 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'C. Tonussi'.

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'A. Aguiar'.

Aderbal Silva Aguiar Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

APÊNDICE A - Declaração de consentimento

Fui devidamente esclarecida sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios aos animais pelos quais sou responsável. Fui também informado que posso retirar meus animais do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação dos meus animais identificados, a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Castilho/São Paulo, ____ de _____, 2017.

Nome Responsável pelo animal: _____

Assinatura: _____

Nome Pesquisador Responsável: Cristiane da Silva de Souza Corrêa

Documento de Identidade: 27 766 553-x

Assinatura: _____

**Identificação dos animais – Espécie: Bovinos – Linhagem: Mestiço-
Idade: 3 a 10 anos**

Grupo - T	Grupo - NT
Identificação dos animais Nome: Número de identificação:	Identificação dos animais Nome: Número de identificação:
Identificação dos animais Nome: Número de identificação:	Identificação dos animais Nome: Número de identificação:

APÊNDICE B - Roteiro para Coleta de Dados (Caraterização da Atividade Leiteira)*NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS PARA O TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO***Propriedade:****Produtor(a):****Número da Propriedade:**

1. Área total da propriedade: _____
2. Área de pastagem: _____
3. Tipo de pastagem: _____
4. Tipo genético dos animais: _____
5. Quantos animais em lactação: _____
6. Produção de leite atual do rebanho: _____
7. Composição da dieta: _____
8. Produção de silagem: _____
9. Tipo de ordenha realizada () mecânica () manual
10. Quantas ordenhas são realizadas diariamente () 1x () 2x
11. É realizado algum procedimento de pré-dipping ou pós-dipping?
12. Qual procedimento é adotado quando uma vaca apresenta alterações visuais no leite (grumo ou sangue)?
13. Por quantos dias é feito o descarte do leite após a parição:

14. Qual o tipo de cobertura (inseminação ou cobertura natural):
15. Já realizou ou realiza algum teste para diagnosticar a mastite, como CMT ou teste da caneta telada?
16. Quando faz o uso de antibióticos no tratamento de alguma doença, por quantos dias o leite é descartado, e qual seu destino?
17. Qual é o procedimento utilizado no momento da secagem do animal?