



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Jarbas Freitas Amarante

**Composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de
própolis frente a isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de mastite bovina.**

Petrolina – PE
2011

Jarbas Freitas Amarante

Composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de mastite bovina.

Dissertação apresentada à coordenação do Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a Dr^a Márcia de F. Ribeiro
Co-orientador: Prof^o Dr Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina - PE

2011

Amarante, Jarbas Freitas

A485c Composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de *Staphylococcus spp.*, obtidos de mastite bovina / Jarbas Freitas Amarante. -- Petrolina, PE, 2011.

56f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, PE, 2011.

Orientadora: Profª Drª Márcia de F. Ribeiro

Co-orientador: Profº Dr Mateus MatiuZZi da Costa

1. Bovinos - Doenças. 2. Mastite Bovina. 3. Agente Antiinfeccioso – Própolis. I.Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 636.2089

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca

SIBI/UNIVASF

Bibliotecário: Lucídio Lopes de Alencar

Jarbas Freitas Amarante

Composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de *Staphylococcus* spp, obtidos de mastite bovina.

Dissertação que será apresentada como parte para a obtenção de título de mestre em Ciência Animal

Petrolina-PE. 31 de Outubro de 2011

Comissão examinadora

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Profª Drª Sônia Avila Botton
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

Dedicatória

Dedico às pessoas que sempre serão o meu exemplo de vida e de quem sempre me orgulharei, meu pai, Manoel Raimundo do Amarante e minha mãe Elizete Maria Freitas do Amarante. E minha noiva Talita Alves Brito que sempre está comigo nos momentos difíceis.

Agradecimentos

A Deus, que nos momentos mais difíceis traz a força, a fé e a perseverança para nunca desistir dos nossos objetivos.

À minha noiva, que com seu amor me dá forças para nunca desistir.

À minha família, mesmo estando distante, o apoio e o amor sempre foram presentes. Ao meu pai, Manoel, a minha mãe Elizete, muito carinho e muita dedicação; ao meu irmão, Emanuel e minha irmã Geysa, a amizade nos une e nos faz cúmplices.

À minha Orientadora Márcia de F. Ribeiro, pela grande contribuição pela a realização deste trabalho.

Ao grande homem, professor Mateus Matiuzzi, seus ensinamentos, conselhos e amizade nunca serão esquecidos, e sempre me guiarão nos próximos desafios que enfrentarei.

Em especial aos meus colegas de trabalho, Eugênio, Valdenice, Hideo, Gutemberg, Deise, Neldson, Mário Alexandre, Mário Cleone, Ana Paula, Gabriela, Sheila, Gease, Francisco Peixoto, Fernanda, Marinaldo, Augusto, Alane Marta, Íris, Roberto César e Raquel.

E muito especialmente a Fredson e Renan que muito contribuíram na execução deste trabalho.

Ao Professor Roberto Jefferson, que forneceu ferramentas importantes para execução dessa pesquisa.

À professora Tânia Sarmento pelo grande auxílio na análise química dos extratos etanólicos de própolis.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, Ceiza, Cari, Wellington, Evandro, Grace, Samilly, Renata, Layse, Samira, Chirles, Isa, Eliene, Gilvan, Aldo, Marielle, Milka, Rodolfo e todos que estiveram presentes nos dias alegres de trabalho, obrigada pela ajuda e pela amizade.

.Aos colegas do mestrado, pelas trocas de experiência e pelas risadas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, pela oportunidade de estar entre os discentes do curso. Por todo apoio que nos é dado.

Aos funcionários do Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF.

E a todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente com o desenvolvimento desse trabalho, serei eternamente grato.

ÍNDICE

	Pág
Lista de Abreviaturas.....	VIII
Lista de Tabelas.....	IX
Lista de Figuras.....	X
Lista de Anexos.....	XI
1. Resumo Geral.....	XII
1.1 Abstract.....	XIV
2. Introdução Geral.....	01
3. Referencial Teórico.....	04
3.1 Mastite.....	04
3.2 Agentes etiológicos da mastite.....	06
3.3 Própolis.....	07
3.3.1. Atividade antioxidante.....	10
3.3.2 Atividade antimicrobiana.....	11
3.3.3 Uso de própolis no tratamento da mastite bovina.....	14
4. Artigo Científico.....	16
4.1 Composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos de mastite bovina.....	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
5. Considerações Finais.....	39
Referências Bibliográficas.....	40
ANEXOS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
MH	Miller Hinton
µg	Micrograma
PBP's	<i>Protein binding to Penicillin</i>
TSA	Tryptona Soy Agar
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
l	Litro
ml	mililitro
nm	nanometro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Referencial Teórico

Tabela1 Resultados referentes à resistência <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de casos de mastite em bovinos leiteiros a alguns antimicrobianos.	7
--	---

Capítulo 2 – Artigo Científico

Tabela 1 Concentração bactericida mínima (CBM) de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. frente a extrato etanólico de própolis	27
Tabela 2 Resultados da análise de fenóis e flavonoides totais e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.	30

LISTA DE FIGURAS

Capítulo – 1 – Referencial teórico

Figura 1 – Ácido cinâmico	8
Figura 2 – Pinocembrina	12
Figura 3 – Galangina	13

Capítulo – 2 – Artigo

Figura 1 Atividade antimicrobiana das própolis sobre os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos de mastite em bovinos sensíveis e resistentes à oxacilina.	29
--	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Curva padrão do ácido gálico 100mg/L	51
Anexo 2 – Curva padrão de quercetina 200mg/L	53
Anexo 3 - Perfil dos compostos fenólicos (ácido cinâmico) da propolis da <i>Apis mellifera</i> . Cromatograma preto: Próplis A, azul, Própolis B, rosa:. Comprimento de onda 290 nm.	55

1- Resumo

O *Staphylococcus* spp. é o principal causador da mastite, uma inflamação das glândulas mamárias em bovinos e que traz sérios prejuízos a produção leiteira. Estes microorganismos podem produzir uma forma subclínica da doença, que pode se tornar difícil de tratar, podendo ainda tornar-se crônica nos animais acometidos. O presente trabalho teve como objetivo, determinar a atividade antimicrobiana da própolis contra isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite bovina, bem como, analisar as principais propriedades químicas de seus compostos. Além disso, buscou-se verificar a sensibilidade simultânea entre a própolis e a oxacilina nos isolados de *Staphylococcus* spp. Para avaliação da atividade antibacteriana da própolis foi utilizada a metodologia de microdiluição para determinação da concentração bactericida mínima (CBM). O teste de sensibilidade à oxacilina foi realizado pelo teste de difusão em disco Kirby Bauer modificado. O perfil químico do extrato foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, para fenólicos totais e o método de Dowd para flavonóides totais. Foi verificada uma sensibilidade de 70/77 isolados (90,9%) dos *Staphylococcus* spp., testados para o Extrato etanólico de própolis A e 64/77 isolados (83,1%) para o extrato etanólico de própolis B. Com 15/77 isolados (19,48%) apresentando resistência ao antimicrobiano oxacilina e 62/77 (80,52%) isolados sensíveis a oxacilina. A concentração bactericida mínima encontrada para a maior parte das amostras foi de 68,7µg/ml. Sendo 22/77 isolados (31,4%) das amostras para o extrato de própolis A e uma concentração de 137,5 µg/ml para 36/77 amostras (46,7%). Obteve-se uma composição fitoquímica de 126,22mg (12,62%) para o extrato A e 73,12mg (7,31%) para o extrato B em relação a fenólicos totais em miligrama de ácido gálico por grama de extrato de própolis e 51,06mg (5,10%) para o extrato A e 17,45mg (1,74%) para o extrato B de flavonóides totais em miligramas de quercetina por grama de extrato de própolis e um resíduo seco de 11,52% do extrato A e 10,37% para o extrato B. Verifica-se uma sensibilidade simultânea por parte dos isolados frente a própolis e oxacilina. O maior efeito bactericida foi evidenciado pela própolis A contra os isolados de *Staphylococcus* spp uma vez que a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides está diretamente relacionada à ação antibacteriana da própolis e também a própolis A. A própolis A apresentou uma concentração maior desses

compostos. Comparando-se concentrações maiores ou iguais a 68,7 µg/ml evidenciou-se que a própolis A é mais eficiente que a própolis B. Pelo método de HPLC foi evidenciada a presença de ácido cinâmico, (principal responsável pela atividade antibacteriana) em maior quantidade na própolis A. Dessa forma o presente estudo verificou a intensa atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis, quando comparado com antimicrobianos convencionais, e por tratar-se de um produto natural representa uma importante contribuição para a saúde pública pois não deixa resíduos prejudiciais a saúde no leite, não causando contaminação ou poluição muito prejudicial ao meio ambiente.

Palavras-chave: difusão, flavonoides, sensibilidade

1. Abstract

Staphylococcus spp. is the main cause of mastitis, an inflammation of the udder in cattle and causes serious damage to milk production. These microorganisms can produce a subclinical form of the disease, which can become difficult to treat, and may become chronic in affected animals. This study aimed to determine the antimicrobial activity of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from cases of bovine mastitis, as well as analyze the main properties of chemical compounds. In addition, we sought to investigate the sensitivity of simultaneous propolis and oxacillin in *Staphylococcus* spp isolates. To evaluate the antibacterial activity of propolis was used microdilution methodology for determining the minimum bactericidal concentration (MBC). The sensitivity test was conducted by the oxacillin disk diffusion test modified Kirby Bauer. The chemical profile of the extract was determined by Folin-Ciocalteu method for total phenolic and Dowd method for total flavonoids. It was verified a sensitivity of 70/77 isolates (90.9%) of *Staphylococcus* spp., Tested for ethanolic extract of propolis isolated A and 64/77 (83.1%) for the stratum of propolis ethanolic B. With isolated 15/77 (19.48%) showing resistance to antimicrobial oxacillin and 62/77 (80.52%) isolates sensitive to oxacillin. The minimum bactericidal concentration found for most of the samples was 60.7 g / ml. Since 22/77 isolates (31.4%) of the samples to extract A and proposes a concentration of 137.5 mg / ml for 36/77 samples (46.7%). We obtained a phytochemical composition of 126.22 mg (12.62%) to extract A and 73.12 mg (7.31%) to extract B in relation to total phenolic content in milligrams of gallic acid per gram of propolis extractmg and 51.06 (5.10%) to extract the mg and 17.45 (1.74%) for total flavonoids extract B in milligrams of quercetin per gram of propolis extract and a dry residue of 11.52% The extract and 10.37% for the extract B. There is a simultaneous sensitivity on the part of the isolates against propolis and oxacillin. The greatest bactericidal effect was evidenced by the propolis against *Staphylococcus* spp isolated since the amount of phenolics and flavonoids is directly related to the antibacterial action of propolis and propolis also A. Propolis A showed a higher concentration of these compounds. Comparing concentrations greater than or equal to 60.7 mg / ml showed that propolis is more effective than the propolis B. By using an HPLC showed the presence of cinnamic acid, (responsible for the antibacterial

activity) in greater quantities in propolis A. Thus the present study found a strong antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis, compared with conventional antibiotics, and this is a natural product represents an important contribution to public health because it leaves no harmful residues in milk health, not causing contamination or pollution very harmful to the environment

Key Words: diffusion, flavonoides, sensibility

2 - Introdução Geral

A produção de leite no Brasil é da ordem de vinte bilhões de litro/ano, sendo importada para atender o mercado interno tem sido importada uma quantidade de dois bilhões de litros nos últimos anos. O rebanho leiteiro dos Estados Unidos, que é de aproximadamente nove milhões de animais, menor que o brasileiro, porém sua produção anual está na ordem dos setenta bilhões de litros (LEVISON e JAWETZ, 1998). A baixa produtividade nacional determina sérias conseqüências econômicas e sociais, sendo reflexo de vários fatores como, o fraco potencial genético dos animais, manejo inadequado, mão-de-obra não qualificada, baixo nível de tecnologia, política econômica ineficiente e a existência de vários problemas sanitários nos rebanhos, tais como a mastite que é uma das maiores causas de perdas na produção leiteira (COSTA, 1999).

Em Pernambuco, está crescendo segundo o IBGE, (2007), a produção leiteira do estado cresce em ritmo acelerado, possuindo o quarto maior rebanho da região Nordeste, porém aparece como o segundo maior produtor de leite da região, perdendo apenas para estado da Bahia. Silva et al. (2008) cita que 81% do território (sobretudo o Agreste pernambucano), apresentam condições estressantes para o gado de leite, muito relacionadas ao clima, ameaçando toda a produção leiteira do estado, afetando principalmente animais de alto nível de produção, representando perdas que variam de 0,85 a 5,70 kg de leite por animal ao dia .

Esse fator climático pode desencadear diversos problemas no rebanho leiteiro pois, por se tratar de rebanhos em criação extensiva, facilita bastante a ocorrência e a proliferação de doenças devido às altas temperaturas na maioria das vezes aliadas a falta de sanidade nos rebanhos, ao estresse e debilidade orgânica dos animais, com isso os produtores utilizam indiscriminadamente diversos antimicrobianos. As altas temperaturas e variações constantes do clima também podem alterar a distribuição das pragas, além de diminuir a qualidade e a produção de plantas forrageiras, prejudicando os animais em lactação (SIROHI e MICAELOWA, 2007). Além de fatores sanitários que influenciam na qualidade do leite, dos quais destacam-se: os zootécnicos, associados ao manejo, saúde da glândula mamária, alimentação e potencial

genético dos rebanhos aquém do esperado, entre outros (SANTOS e FONSECA, 2001). A água utilizada na lavagem de equipamentos e outras tarefas e a falta de higiene com as glândulas mamárias são fatores que facilitam bastante a contaminação do leite pelos chamados patógenos ambientais. É de fundamental importância que a água utilizada nesses procedimentos seja potável e livre de coliformes e de outros microrganismos contaminantes (COUSIN e BRAMLEY, 1981). É necessário uma imersão das glândulas mamárias em solução antisséptica, além de uma boa higienização das mãos dos ordenhadores a fim de se evitar a contaminação das glândulas por microrganismos trazidos pelo ordenhador, além dos equipamentos de ordenha que devem ser bem higienizados, melhorando assim a qualidade higiênica e microbiológica do leite, uma exigência cada vez maior nos mercados consumidores do Brasil e do Mundo (EDMONDSON, 2002, SANTOS et al.,2003).

O uso indiscriminado de antimicrobianos para o combate da mastite bovina seleciona microrganismos patogênicos resistentes aos principais fármacos disponíveis no mercado. A utilização de técnicas de biologia molecular como a Polymerase Chain Reaction ou PCR, pode ser usado para caracterização dos principais patógenos que acometem os rebanhos bovinos, pode representar uma boa forma de diagnóstico para doenças em rebanhos bovinos, contudo não é muito acessível aos produtores podendo melhorar a eficácia na aplicação de antibióticos e o uso de produtos naturais com propriedades antibacterianas, pode representar ótimos resultados na erradicação desses patógenos. Sendo que técnicas que utilizam marcadores genéticos para a detecção de isolados que possuem resistência a agentes antimicrobianos, sobretudo em infecções de caráter crônico, vem também ajudando muito no combate de doenças bacterianas especialmente a mastite bovina (CUSHINE e LAMB, 2005).

Marcucci (1995) estudando as propriedades de extratos de própolis verificou uma intensa atividade antibacterina, antiinflamatória e, sobretudo, imunoestimulante. Os produtos apícolas, a cada dia ganham mais espaços na terapia de várias doenças, dentre elas a mastite bovina. Dentre as vantagens do uso de própolis cita-se boa eficiência terapêutica com menores taxas de toxicidade, e resistência microbiana, além de baixa resistência aos

antimicrobianos. As abelhas *Apis mellifera* além do mel produzem outras substâncias como geléia real e própolis, que tem sido associadas com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, destacando-se dentre elas as propriedades terapêuticas da própolis (WESTON, 2000; NAGAI et al., 2001; NAGAI e INOUE, 2004; STOCKER et al., 2005).

O controle de qualidade, o valor nutricional e o monitoramento de resíduos tóxicos, bem como o combate a contaminação bacteriana em alimentos tem se destacado recentemente como os principais itens de interesse público, devido aos altos prejuízos causados pelos microrganismos, sobretudo, os *Staphylococcus*, principais causadores da mastite (IBANEZ e CIFUENTES, 2000).

Dessa forma os produtos oriundos da abelha *Apis mellifera*, tem sido amplamente estudados, e aplicados como de suplementos na alimentação, em função da sua ampla atividade biológica que os mesmos apresentam no que diz respeito, sobretudo, à atividade antimicrobiana.

Objetiva-se no estudo avaliar o perfil químico e atividade antibacteriana “*in vitro*” de dois extratos etanólicos comerciais de própolis contra *Staphylococcus* spp. causadores de mastite bovina, relacionando-os com a resistência a oxacilina.

3 - Referencial Teórico

3.1. Mastite

O leite constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades. Além disso, ele é praticamente o único alimento para os animais e humanos na primeira etapa da vida. O leite mais usado na alimentação humana é o bovino, seguido pelo caprino (SGARBIERI, 1996). Assim, é preciso que o leite e os seus derivados apresentem condições higiênicas, sanitárias e microbiológicas adequadas. É imprescindível que o leite a ser ingerido seja isento de qualquer tipo de contaminação por agentes patogênicos e por qualquer resíduo de antibióticos (COVA, 1984).

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

A mastite constitui a doença que mais afeta a sanidade dos rebanhos leiteiros (PHILPOT e NICKERSON, 2002; KORHONEN e KAARTINEN, 1995). A mastite pode ser classificada considerando-se a forma de apresentação em clínica e subclínica. A clínica se caracteriza por leite visivelmente anormal e pela evidência de graus variados de inflamação do úbere (calor, tumefação e dor) (SMITH, 1994). Essa forma de mastite pode ter efeitos medianos quando ocorrem apenas mudanças no aspecto do leite, enquanto que a forma hiperaguda da doença é caracterizada por uma severa sintomatologia sistêmica (RADOSTITS et al., 1994; National Mastitis Council, 1998). Já a forma subclínica da mastite ocorre pela infecção da glândula mamária aumentando a contagem das células somáticas (CCS) e células de descamação do epitélio, acima de 500000 células/mL (National Mastitis Council, 1998). Este aumento no número de leucócitos é influenciado principalmente pelo estado infeccioso (HARMON, 1994), mas outros fatores como a fase de lactação, idade do animal, estação do ano e vários tipos de estresse podem influenciar a contagem de células somáticas, sendo de pouca importância se não ocorre

infecção concomitante da glândula mamária (RENEAU, 1986; HARMON, 1994). A mastite subclínica é diagnosticada por provas como o “*Califórnia Mastitis Test* – CMT (SCHALM e NOORANDER, 1957), essa forma de mastite responde por até 95% dos casos no rebanho (FONSECA e SANTOS, 2000).

A mastite também pode ser classificada em contagiosa e ambiental, considerando-se as características do agente etiológico (FONSECA e SANTOS, 2000). A forma contagiosa ocorre quando as bactérias são transferidas da glândula mamária de vacas infectadas para outras sadias, através de equipamento de ordenha contaminado, pelos bezerros ao mamar ou pelas mãos dos ordenhadores. A ambiental ocorre quando bactérias distintas da glândula mamária têm acesso a glândula por meio do esfíncter da teta, causando a mastite (SMITH, 1994).

Os microrganismos que comumente causam mastite podem ser derivados de dois grupos, baseando-se na sua origem: patógenos ambientais e patógenos contagiosos. Os contagiosos estão adaptados à sobrevivência no interior da glândula mamária. Por outro lado os patógenos ambientais são melhores descritos como invasores oportunistas do úbere, não adaptados a sobreviver no seu interior, vivendo no ambiente contaminado que apresenta condições sanitárias precárias, fornecendo o ambiente perfeito para a proliferação desses microrganismos (WATTS, 1988). Os coliformes são as mais representativas desta categoria de patógenos causadores da mastite (SMITH, 1994).

Na Costa Rica os relatos de Graaf e Dwinger (1996), demonstram as perdas na produção de leite em vacas com mastite subclínica, onde foram estimadas em 1,56 kg de leite ao dia, por vaca, totalizando perdas na produção de 17,6% em média, por quarto mamário afetado.

A mastite é considerada a doença que causa os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pois na maioria dos rebanhos leiteiros não existe um programa de controle efetivo. As principais causas dessas perdas são: diminuição na produção de leite, custo de tratamento, leite descartado, descarte precoce dos animais doentes e redução na qualidade do leite. Representando um prejuízo de 200 a 300 dólares por vaca, chegando a um total de 1,5 a 3,0 bilhões de dólares por ano (HOGAN e SMITH, 1997). A mastite causa uma inflamação das glândulas mamárias, que provoca grandes

prejuízos diminuindo drasticamente a qualidade do leite. Também ocasiona prejuízos à indústria de laticínios (REBHUN, 2000), chegando a reduzir a produtividade de leite em até 50%, e uma perda leiteira de 15% por vaca a cada ano (LADEIRA, 2007).

3.2. Agentes etiológicos da mastite

Os patógenos contagiosos mais importantes da mastite bovina são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*. Dentre os patógenos ambientais, destaca-se a *Escherichia coli* e o *Streptococcus uberis* (MENDONÇA et al., 1999). Os agentes bacterianos que têm sido apontados como os maiores responsáveis pelos casos de inflamação mamária, são as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp, causando inúmeros casos de mastite intramária em ruminantes (CONTRERAS, et al., 2007).

Bactérias, de maneira geral, apresentam resistência a agentes antimicrobianos, sendo essa característica de extrema importância, principalmente, quando levado em consideração o manejo de animais de criação como, por exemplo, os bovinos. Em especial pode ser citada a ampla resistência de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos nestes microrganismos, sendo que estes estão agrupados em famílias gênicas. Como, por exemplo, podem ser citados os genes: *tet* (P), (K), (L), (O), (T) e (W) de resistência a tetraciclina, *erm* (A), (B) e (C) de resistência a eritromicina, *blaZ* para beta lactâmicos e o gene *mec* (A) para meticilina e principalmente observa-se bactérias resistentes a oxacilina (VANCRAEYNEST et al., 2004). A média de resistência aos antimicrobianos por isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite pode ser observado na tabela 1, onde se verifica grandes discrepâncias associados ao tipo de droga analisada.

O uso de antimicrobianos traz consigo perdas econômicas, pela proibição da comercialização de leite e seus derivados contendo resíduos de antibióticos e outros componentes bacteriostáticos, uma vez que interferem na fabricação de alguns produtos lácteos e trazem riscos à saúde da população que os consome (BISHOP et al., 1984; JOHNSON, 1993).

Tabela1- Resultados referentes à resistência *in vitro* dos principais agentes etiológicos isolados de casos de mastite em bovinos leiteiros a alguns antimicrobianos.

Antibióticos	<i>Staphylococcus</i> spp (%) resistência		
	1	2	3
Penicilina	11,3	52,8	39,1
Ampicilina	56,5	52,8	39,1
Oxacilina	10,6	77,8	21,7
Tetraciclina	N/A	41,7	21,7
Lincimicina	N/A	44,5	N/A
Eritromicina	12,9	N/A	13
Estreptomicina	N/A	N/A	47,8
Sulfazotrin	14,3	5,6	0
Gentamicina	10,6	11,2	8,7
Cefalotina	3,2	19,5	13
Enrifloxacina	3,2	N/A	17,4
Neomicina	10,3	8,4	0
Kanamicina	N/A	N/A	4,3
Cefoxitina	11,3	N/A	13

Fonte: 1 Santos e Tanaka,1990; Pimenta, 2 Reis e Souza, 2005; 3 Oliveira, et al., 2011,. N/A – Não analisado.

3.3. Própolis

A palavra própolis tem sua origem no idioma grego, sendo que *pro* significa “em defesa de” e *polis* significa “cidade”, (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). É uma substância com consistência de resina ou cera (KUJUMGIEV et al., 1999). As abelhas recolhem essa substância em brotos, cascas de árvores e partes vegetais variadas, transportam-na para a colmeia, adicionando cera e secreções salivares, alterando, a sua composição química (GHISALBERTI, 1979). As abelhas usam a própolis para fechar frestas na colmeia, envolvendo e eliminando invasores indesejados (CRANE, 1997).

A própolis apresenta consistência e coloração variada, assim como sua composição depende da biodiversidade do pasto apícola (PARK et al., 2000). Seus componentes químicos (mais de 200 substâncias) estão distribuídos entre os seguintes princípios ativos: ácidos fenólicos, flavonóides, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, alcoóis, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (PARK et al., 2002), além de ácido cinâmico (Figura 1) e seus ésteres (MARCUCCI, 1995), bem como os diterpenos

(BANSKOTA et al., 1998). A composição química da própolis varia de acordo com os fatores como: flora apícola que apresenta uma grande diversidade ao longo do país (cerrado, caatinga, mata atlântica etc), a geografia do local e até mesmo a genética da abelha, pois isso vai causar uma variação nos compostos misturados pela abelha à resina vegetal coletada (VELOSO - JÚNIOR, 2000).

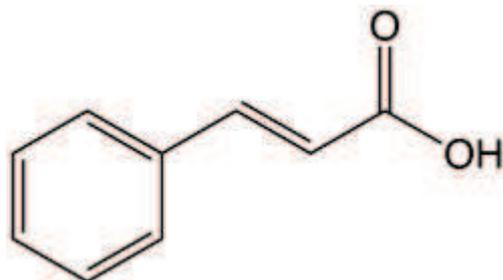


Figura 1 – Ácido cinâmico – Fonte: Tiosan.

No geral, a própolis é composta de 50% de resina e bálsamo de vegetais, 30% de cera, onde apresenta o maior número de impurezas, 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de diversas substâncias (SILVA et al., 2008). Sendo a principal substância biologicamente ativa da própolis os compostos denominados de flavonóides (GUISALBERTI, 1979; PARK et al., 1998), os principais responsáveis pelas ações antiinflamatória, antimicrobiana e antifúngica (CUSNHIE e LAMB, 2005). Essas atividades estão relacionadas conjuntamente com os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos (SALATINO et al., 2005).

A pinocembrina, galangina, acacetina, apigenina, quercetina, rutina, rhamnetina e chrisina são os flavonóides mais encontrados e estudados (BANKOVA et al., 1995; BONVEHI et al., 1994; MATTOS et al., 1999).

A própolis é usada empiricamente desde a antiguidade por civilizações consideradas por possuírem alto grau de desenvolvimento como os egípcios, maias, gregos e romanos (BONTEMPO, 2008). As diversas ações farmacológicas da própolis vêm sendo estudadas cientificamente nos últimos anos, principalmente utilizada na prevenção de enfermidades infecciosas em seres humanos. A gama de produtos farmacêuticos à base de própolis vem crescendo nos últimos anos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2005).

A própolis possui um longo histórico de combate a doenças de diversos tipos em especial as causadas por *Staphylococcus* spp., vários estudos vem

demonstrando sua ação contra bactérias Gram-positivas, também revelando que a própolis teria o efeito de coordenar a ação de antibióticos selecionados contra isolados bacterianos. Entretanto, não se tem dados conclusivos a respeito da ação da própolis contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (CASTALDO e CAPASSO, 2002, YILDIRIM et al., 2004, OTA et al., 2001, GORDIEN et al., 2009).

A possibilidade da combinação de extratos de própolis com antimicrobianos poderá permitir a redução da dose clínica de determinados antimicrobianos e, assim, diminuir a incidência de efeitos colaterais. Também potencializará a aplicação da terapêutica antimicrobiana no tratamento de infecções em que a resistência bacteriana torna-se fator determinante (MIRZOEVA, 1997).

No Brasil, os estudos a respeito da própolis começaram entre o final da década de 70 e começo dos anos 80 (MAKASHVILI, 1975). Segundo Bontempo (2008), a própolis verde brasileira é considerada a melhor e mais eficiente do mundo, pelo fato do Brasil apresentar clima e meio ambiente favoráveis para as abelhas produzirem própolis com essa qualidade superior. Esse produto possui além das propriedades terapêuticas citadas, acredita-se que possa apresentar efeitos anestésicos e fatores de prevenção ao câncer (DOBROWOLSKI, 1991; TSAKOFF, 1978), pois o princípio ativo da própolis é termicamente estável, conservando sua ação antimicrobiana mesmo após ser submetida à temperatura de 100°C por meia hora (PYORALA e PYORALA, 1998).

Reações alérgicas a própolis podem ocorrer, mas teoricamente ela é relativamente atóxica (SANTOS et al., 1999). Essa reação anafilática pode ser uma resposta de hipersensibilidade, mas esse mecanismo não está totalmente elucidado (PAULINO, 1999). Burdock (1998), não observou nenhuma reação alérgica em 90 camundongos que receberam própolis na dose de 1400 mg/kg ao dia.

Devido às várias propriedades biológicas da própolis, seu uso vem crescendo intensamente, assim como na medicina familiar e em produtos domésticos e alimentícios (BURDOCK, 1998).

3.3.1 Atividade Antioxidante

As moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados, apresentando função oxidante ou redutora de elétrons, recebem o nome de substâncias reativas ao oxigênio. Sendo produzido em processos metabólicos, atuando como mediadores, transferindo elétrons e participando em processos bioquímicos, desempenhando funções relevantes no organismo (MOREIRA e SHAMI, 2004).

O acúmulo excessivo de substâncias reativas ao oxigênio pode levar a diversos danos à célula, além do desenvolvimento de doenças (artrite, diabetes, catarata, câncer e cardiopatias) (MOREIRA e SHAMI, 2004).

Antioxidantes são substâncias, que em baixas concentrações no organismo, regeneram o substrato, prevenindo significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 2000).

A indústria de alimentos, de cosméticos, de bebidas vem utilizando compostos antioxidantes, visto que, os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (HALLIWELL et al., 1995).

O extrato etanólico e aquoso de própolis apresentam uma atividade antioxidante bastante significativa (PARK et al., 1998). Sendo essa atividade conferida pela presença de flavonóides na sua constituição (PRATT e BIRAC, 1979).

Comparando-se a atividade antioxidante do mel com a geléia real e a própolis, notou-se que a própolis mantém suas características farmacológicas por um período muito maior mesmo quando mantida a 100°C (NAGAI et al., 2001). Existindo assim uma correlação muito grande entre o poder de antioxidante da própolis e sua quantidade de fenóis, pois os mesmos combatem os compostos oxidantes produzidos na célula, evitando problemas fisiológicos em seu interior (BURATTI et al., 2006)

Isla et al. (2001) encontraram alta atividade antioxidante de um tipo de própolis argentino, estando correlacionado com o conteúdo fenólico, contudo acreditam que outros fatores podem estar envolvidos.

A liberação de enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase é potencializada pela própolis (BONAN e COHEN, 1992), principalmente na

presença de radicais alquilas, aldeídos e cetônicos, barrando a proliferação ou destruindo esses radicais livres (BUCKLEY et al., 1995).

3.3.2 Atividade Antimicrobiana

A própolis exerce diversas atividades biológicas no organismo, das quais se destaca o poder antimicrobiano, que atua eficientemente sobre vários microrganismos. Esta característica tem despertado o interesse de vários pesquisadores a fim de elucidar o mecanismo principal associado à atividade antimicrobiana (SFORCIN, 1999).

Entre os principais mecanismos associados às suas atividades antibacterianas podemos citar a desorganização do citoplasma, da membrana plasmática e da parede celular (LEVY, 1999). Dessa forma, os antimicrobianos como a própolis podem inibir a capacidade de crescimento de microrganismos (PARADISI et al., 2002). Princípio este ligado intimamente à presença de compostos como flavonóides e fenóis (HULIN et al., 1998).

A atividade antibacteriana é demonstrada por meio da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), avaliando substâncias com potencial antimicrobiano conforme a mudança de cor nas microplacas com reagentes específicos para cada microrganismo analisado (CABRAL et al., 2008).

Sendo, que a atividade antimicrobiana da própolis é largamente relatada, apresentando um efeito inibitório intenso sobre o crescimento microbiano (NAGAI et al., 2006).

Mostrou-se também que tanto o mel quanto a própolis provenientes de *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula* demonstraram ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, confirmando também que as amostras de mel apresentam atividade, contudo, esta foi mais baixa quando comparada com a própolis (MIORIN, 2003). O extrato etanólico de própolis também apresenta ação antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus* (LEE et al., 2005).

Amostras de própolis de diferentes origens geográficas apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; antifúngica contra *Candida albicans* e antiviral, contra vírus da influenza aviária. A própolis tem combatido ativamente fungos e bactérias Gram positivas, e

também demonstrando o máximo de atividade antiviral (KUJUNGIEV et al., 1999).

Amostras da zona temperada apresentam efeitos antibacteriano, antifúngico e antiviral, assim como as oriundas das zonas tropicais apesar de apresentarem substâncias diferentes, logo, a combinação de diferentes substâncias é essencial para o efeito biológico da própolis (KUJUNGIEV et al., 1999).

Meresta e Meresta (1985) constataram a sensibilidade de 75 cepas de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. ao extrato de própolis, dessas, 69 foram caracterizados como altamente sensíveis a própolis.

A atividade antimicrobiana de duas amostras de própolis provenientes do Chile foi mostrada mediante a determinação de CIM e CBM, utilizando-se cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, comprovando a atividade antibacteriana especialmente contra o *Staphylococcus aureus*, o qual apresentou menores CBM (VALDES, 1996).

A atividade antimicrobiana da própolis deve-se especialmente aos flavonóides pinocembrina (Figura 2) e galangina (Figura 3) (BANKOVA et al., 1995). Esta atividade também tem sido relacionada ao ácido benzóico e fenólico (DONADIEU, 1980, FERNANDES JR, 1995). Em estudo desenvolvido por Mirzoeva et al. (1997), o extrato etanólico de própolis apresenta atividade bactericida, pela presença de muitos ingredientes ativos e lábeis, apresentando maior efeito contra bactérias Gram positivas.

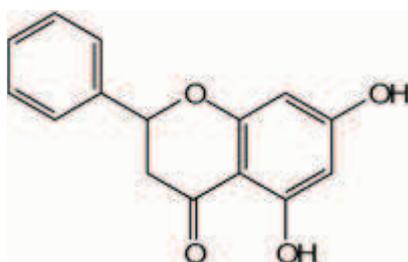


Figura 2 – pinocembrina – Fonte: Tiosan

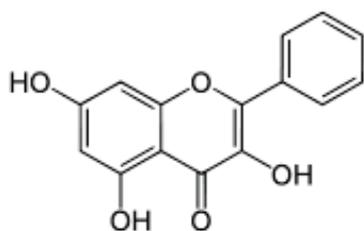


Figura 3 – galangina – Fonte: Tiosan

O extrato de própolis mostrou um sinergismo com alguns antimicrobianos de uso comum, onde amostras de *Staphylococcus aureus*, com resistência à , alguns antimicrobianos apresentaram-se sensíveis numa CIM menor do que quando tratado apenas com medicamento antibacteriano mostrando uma eficiência 70% maior das amostras testadas com a combinação própolis-antimicrobiano (KEDZIA e HOLDERNA, 1986). Esta ação sinérgica também foi comprovada frente a várias drogas antimicrobianas como: penicilina G, doxicilina, estreptomicina, cloxacilina, clorafenicol, cefradina, ampicilina e polimixina B, mas apenas quando a própolis foi incorporada numa concentração de 600 mg/ml (KROL et al., 1993). Essas drogas agem diretamente na formação da parede celular bacteriana impedindo a formação da camada de peptidoglicano, contudo na presença do gene *mecA*, há uma baixa afinidade aos β -lactâmicos, formando um mutante resistente a oxacilina (BOYLE-VAVRA et al., 2003, KATAYAMA et al., 2004).

Acredita-se que a combinação de extratos de própolis com antimicrobianos, possa levar a uma redução na quantidade destes fármacos, assim, a pressão para emergência de cepas resistentes, bem como a diminuição nos efeitos colaterais e, principalmente, nos resíduos de substâncias antimicrobianas em produtos de origem animal, especialmente, no leite e no meio ambiente (MIRZOEVA et al., 1997).

Quando se compara os compostos químicos, responsáveis pela atividade antibacteriana, não se encontram nenhum efeito sinérgico com os compostos de natureza química responsáveis pela atividade antioxidante, ao se comparar as frações do extrato de própolis vermelha e o extrato puro (CABRAL, 2008).

3.3.3 Uso de própolis no tratamento da mastite bovina

O primeiro tratamento com extrato de própolis no combate da mastite bovina foi realizado por Mirolyubov e Barskov (1980), sendo utilizadas nesse ensaio, pomadas à base de própolis. Em animais portadores de mastite serosa e catarral, administrou-se uma pomada com 2% de extrato etanólico de própolis, já na mastite purulenta e hemorrágica, aplicou-se a pomada a 5%, ambas pela via intramamária, aplicando-se 5 ml duas vezes ao dia e 7 ml durante a noite. Dessa forma, as pomadas de concentração 2% e 5% apresentaram um ótimo efeito no tratamento da mastite, encurtando o processo de cura.

Cepas de *Staphylococcus aureus*, testadas *in vitro* e isoladas de mastite bovina, foram submetidas a tratamento com extratos de própolis originários da Polônia, mostraram uma concentração inibitória mínima (CIM) em torno de 80 mg/mL (MERESTA e MERESTA, 1985b).

O tratamento da mastite bovina com extrato de própolis, resultou numa recuperação completa em 86,6% dos casos de mastite aguda, 91% das causadas por *Staphylococcus aureus*, 10% das ocasionadas por *Candida albicans*, 85% das associadas a *Escherichia coli* e 84% das mastites causadas por *Streptococcus* spp. mostrando assim uma ação bastante efetiva no tratamento de enfermidades associadas a patógenos resistentes (MERESTA et al., 1989).

O extrato etanólico de própolis em estudos *in vitro* demonstra ótimos resultados devido a sua ação de inibir o crescimento microbiano, pois, impede a divisão celular, leva a bacteriólise, já que produz defeitos na parede celular, desorganiza o citoplasma, além de inibir a síntese proteica (TAKAISI-KIKUMI, SCHILCHER, 1994). Devido a esses fatores inibitórios um estudo realizado por Pinto (2000), mostrou que o extrato de própolis limitou ou parou por completo o crescimento bacteriano em amostras de bactérias Gram-positivas, sendo ineficaz quando testada com bactérias Gram-negativas.

O uso prolongado e indiscriminado de antimicrobianos em tratamentos de mastite bovina é o responsável pelo desencadeamento de resistência em diversas cepas de microrganismos, em especial *S. aureus* coagulase positiva (TAVARES, 2000).

Alternativas de tratamento da mastite vêm sugerindo o emprego do extrato etanólico de própolis, auxiliando na diminuição dos prejuízos econômicos gerados em rebanhos leiteiros, tornando o produto mais seguro á saúde pública e ao meio ambiente, uma vez que há queda acentuada de resíduos das substâncias antimicrobianas nos produtos de origem animal (TAVARES, 2000).

4. Artigo Científico

4.1-Composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de mastite bovina.

Jarbas Freitas Amarante¹, Márcia de F. Ribeiro², Mateus Matiuzzi da Costa¹.

1 – Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

2 – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CPATSA - EMBRAPA

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade antimicrobiana da própolis contra isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite bovina provenientes de propriedades leiteiras da região Nordeste, bem como analisar as suas propriedades químicas principais. Além disso, buscou-se demonstrar uma ação simultânea de resistência e a sensibilidade entre a própolis e a oxacilina frente a isolados de *Staphylococcus* spp. Na avaliação da atividade antibacteriana da própolis foi utilizada a metodologia de microdiluição para determinação da concentração bactericida mínima (CBM). O teste de sensibilidade à oxacilina foi realizado pelo teste de difusão em disco Kirby Bauer modificado. O perfil químico do extrato foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, para fenólicos totais e o método de Dowd para flavonóides totais. Foi verificada uma sensibilidade de 70/77 dos isolados, (90,9%) dos *Staphylococcus* spp. para o extrato de própolis A e 64/77 dos isolados (83,1%) para a própolis B. Com 62/77 isolados sensíveis a oxacilina e 15/77 apresentando resistência ao antimicrobiano. A concentração bactericida mínima (CBM) encontrada para a maior parte das amostras foi de 68,7µg/ml 22/77 (31,4%) das amostras para própolis A e uma concentração de 137,5 µg/ml para 36/77 (46,7%) Comparando-se concentrações maiores ou iguais a 68,7 µg/ml evidenciou-se que a própolis A é mais eficiente que a própolis B. Assim como uma composição química de 126,22mg (12,62%) para o extrato A e 73,12mg (7,31%) para o extrato B de fenólicos totais por miligrama de ácido gálico por grama de extrato de própolis e de 51,06mg (5,10%) para o extrato A e 17,45mg (1,74%) para o extrato B de flavonóides totais por miligrama de quercetina por grama de extrato de própolis e um resíduo seco de 11,52% do extrato A e 10,37% para o extrato B. Também evidenciando que os fatores

antioxidantes da própolis estão ligados diretamente com a presença de compostos fenólicos e de flavonóides. Demonstrando uma sensibilidade simultânea por parte da própolis e da oxacilina frente aos isolados bacterianos. Com maior efeito por parte da própolis A em relação a B, pois se demonstra uma menor Concentração Bactericida Mínima da própolis A contra os isolados de *Staphylococcus* spp, visto que a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides estão diretamente ligadas à ação antibacteriana da própolis e também a própolis A é mais eficiente por apresentar uma concentração maior desses compostos. Como foi evidenciado pelo método de HPLC a presença de ácido cinâmico, em maior quantidade na própolis A em relação à própolis B. Dessa forma o presente estudo verificou a intensa atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis, quando comparado com antimicrobianos convencionais, e por tratar-se de um produto natural representa uma importante contribuição para a saúde pública pois não deixa resíduos prejudiciais a saúde no leite, não causando contaminação ou poluição muito prejudicial ao meio ambiente.

Palavras-chave: compostos fenólicos, microdiluição, *Staphylococcus* resistentes à oxacilina.

4.2- Chemical composition and antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from bovine mastitis.

Jarbas Freitas Amarante, Márcia de F. Ribeiro, Mateus Matiuzzi da Costa.

1 – Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

2 – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CPATSA - EMBRAPA

ABSTRACT

This study aimed to determine the antimicrobial activity of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from cases of bovine mastitis from dairy farms in the Northeast, and analyze their main chemical properties. In addition, we sought to demonstrate a simultaneous action of resistance and sensitivity between propolis and oxacillin against isolates of *Staphylococcus* spp. In assessing the antibacterial activity of propolis was used microdilution methodology for determining the minimum bactericidal concentration (MBC). The sensitivity test was conducted by the oxacillin disk diffusion test modified Kirby Bauer. The chemical profile of the extract was determined by Folin-Ciocalteu method for total phenolic and Dowd method for total flavonoids. It was verified a sensitivity of 70/77 of the isolates (90.9%) of *Staphylococcus* spp. proposes to extract A and 64/77 isolates (83.1%) for propolis B. With oxacillin-susceptible isolates 62/77 and 15/77 presenting antimicrobial resistance. The minimum bactericidal concentration (MBC) found for most of the samples was 68.7 mg / ml 22/77 (31.4%) of propolis samples A and a concentration of 137.5 mg / ml in 36/77 (46.7%) comparing concentrations greater than or equal to 60.7 mg / ml showed that propolis is more effective than the propolis B. As a chemical composition of 126.22 mg (12.62%) to extract A and 73.12 mg (7.31%) to extract total phenolic B per milligram of gallic acid per gram of propolis extract and 51,06mg (5.10%) to extract A and 17.45 mg (1.74%) to extract B per milligram of total flavonoids quercetin per gram of propolis extract and a dry extract of 11.52% A and 10.37% for the extract B. Also showing that the antioxidant properties of propolis factors are directly linked with the presence of phenolic compounds and flavonoids. Demonstrating a sensitivity of propolis by simultaneous and

oxacillin against the bacterial isolates. With the greatest effect of propolis by A with respect to B, because it shows a lower minimum bactericidal concentration of propolis against *Staphylococcus* spp isolates, since the amount of phenolic compounds and flavonoids are directly linked to the antibacterial action of propolis and also The propolis is more efficient because it has a higher concentration of these compounds. As evidenced by the HPLC method the presence of cinnamic acid, in greater quantities in propolis propolis in relation to the B. Thus the present study found a strong antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis, compared with conventional antibiotics, and this is a natural product represents an important contribution to public health because it leaves no harmful residues in milk health, not contamination or pollution causing very harmful to the environment.

Word-key: fenólicos, microdiluição, oxacilina.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de leite, como outros seguimentos da atual sociedade é uma atividade cada vez mais competitiva, totalizando 25,4 bilhões de litros anualmente. Dessa forma, o importante na produção é cada vez mais a busca pelo lucro na tentativa de suprir o mercado nacional. Os problemas com microrganismos patogênicos acarretam a diminuição da secreção láctea, enfraquecendo e prejudicando a capacidade de produção, além de representar importante risco à saúde pública (IBGE, 2007).

A mastite caracteriza-se por uma inflamação da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada em clínica e subclínica. A mastite clínica apresenta sinais evidentes tais como: aumento da temperatura, endurecimento, dor na glândula, pus, grumos, bem como formação de edema, provocando assim diversas alterações indesejáveis nas características do leite (FONSECA e SANTOS, 2000).

A forma subclínica não apresenta alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite, não aparecendo sinais de inflamação no úbere (CULLOR et al, 1994, KRUMPERMAN, 1983). O leite proveniente de vacas contaminadas com mastite apresenta modificações consideráveis em sua composição, alterando dessa forma, suas características organolépticas, físicas, químicas e microbiológicas (VIANNI e LÁZARO, 2003).

No Brasil, segundo Brant e Figueiredo (1994), é alta a prevalência de mastite subclínica, com índices variando de 44,8% a 97% e a redução da produção de leite situa-se entre 24,4% e 43,0%.

Vários são os agentes etiológicos causadores da mastite bovina, cerca de 140 espécies diferentes, onde se observa a predominância de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (SCHOCKEN – ITURRIN et al., 1996). Dentre os agentes etiológicos mais isolados em casos de mastite subclínicas, destacam-se os *Staphylococcus* coagulase positivos e coagulase negativos, os *Streptococcus* spp. e o *Corynebacterium bovis* (MENDONÇA et al., 1999).

A própolis revelou-se como um importante fator de combate aos microrganismos devido a seu potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e imunológico, tanto na medicina humana e principalmente na medicina

veterinária, sobretudo, no tratamento de animais de produção (PEDRINI & MARGATHO, 2003). Os tratamentos convencionais no combate da mastite bovina trazem alto custo à produção, além de levar a uma resistência bacteriana aos antimicrobianos, levando-se a busca de alternativas fitoterápicas, sendo a própolis o principal composto desses tratamentos, porém, nem todo esse tratamento tem respaldo científico, necessitando de mais estudos na área (CRISAN et al., 1995, TAVARES, 2000). A atividade antibacteriana da própolis baseia-se, sobretudo na presença de compostos denominados flavonóides, sendo sua ação verificada principalmente sobre a parede celular bacteriana, desorganizando a sua síntese e a consolidação na bactéria (BANKOVA, 1995, BONVEHI, 1994, GRANGE, 2005, LANGONI, 1994).

Assim, objetivou-se Avaliar o perfil físico químico e atividade antibacteriana “*in vitro*” de dois extratos etanólicos comerciais de própolis contra *Staphylococcus* spp. causadores de mastite bovina, relacionando-os com a resistência a oxacilina.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi executado no laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, no Campus de Ciências Agrárias, município de Petrolina no Estado de Pernambuco, no período de 2010 a 2011.

Amostras

Foram utilizadas 77 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite bovina provenientes de propriedades leiteiras da região Nordeste do Brasil e armazenados na bacterioteca do laboratório. Para seu uso, os isolados foram repicados em Agar TSA (*Tryptone Soy Agar*). Foram testados três isolados mutiresistentes, sendo uma de MRSA e duas de ATCC, identificadas como ATCC 6538 e ATCC 25923.

Própolis

Os isolados bacterianos foram testados frente a duas própolis comerciais sendo uma proveniente da região sudeste mais especificamente do Estado de São Paulo- SP, identificado como extrato A e outra do Estado da Bahia, identificado como extrato B. Ambos forma usados nos testes de atividade antibacteriana e análises de composição química das amostras de extrato etanólico de própolis.

Microdiluição e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As amostras semeadas em meio de cultura TSA (Tryptone Soy Agar), foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de meio MH (Mueller Hinton caldo), em média foram inoculadas de 3 a 4 colônias. Incubou-se o MH a 37°C por 24 horas de acordo com CSLI (2006).

Após 24 horas, turvou-se o meio a 0,5 na escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL). Inoculando-se a suspensão 0,1 ml (MH+inóculo), em tubos contendo 9,9 ml de caldo Mueller Hinton (NCCLS, 2002). Logo após, procedeu-se a microdiluição colocando-se 200 µl de caldo MH, puro e estéril em cada poço da microplaca, procedendo-se logo em seguida a diluição do extrato de própolis, colocando-se 200 µl de extrato no primeiro poço, seguindo-se uma diluição de 1:2 e descartando-se os últimos 200 µl. Em seguida inoculou-se 10 µl de caldo MH contendo os microrganismos em cada poço, além de poços contendo controles positivo e negativo, incubou- se por 24 horas a 37°C. Após 24 horas inoculou-se o conteúdo de cada poço da microplaca em placas de petri, contendo MH, incubou-se por 24 horas a 37°C. A menor concentração onde não foi observado crescimento no ágar é considerada a CBM, todas as amostras foram inoculadas em triplicata (LENNETTE et al., 1985).

Teste de sensibilidade à oxacilina

O teste de sensibilidade foi realizado pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado (BAUER et al., 1966; CSLI, 2006), com turvação microbiana na escala 0,5 de Mac Farland em caldo MH. As amostras foram

transferidas com *swab* estéril para placas de ágar Müller Hinton, nesta aplicou-se os discos contendo oxacilina (1µg). As placas foram incubadas em estufa durante 24h a 37°C.

Determinação de fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu, que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm, conforme descrito por SWAIN e HILLS (1959)

A quantidade total de fenóis do extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 ml da solução aquosa de extrato (concentração 10 mg/ml) foi adicionada de 2,5 ml de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C e, posteriormente, a absorbância foi medida a 760 nm usando-se o branco como referência, que se constituiu de metanol e comparada com a curva padrão de ácido gálico em cinco pontos de concentração (4, 8, 16, 24, 36 µg/ml). $Y=0,0064x+0,4174$, onde y é a absorbância e x é a concentração; $R^2=0,9577$ (Anexo 1). A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos das amostras foi realizada em triplicata, expresso essa quantidade de fenóis em mg de equivalente de ácido gálico por grama de extrato de própolis, considerando o teor de extrato seco das mesmas, conforme descrito por Roesler (2007).

Determinação de flavonóides

O conteúdo total de flavonóides foi determinado pelo método de Dowd adaptado. Utilizando-se 500µg de sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) a 5% em metanol e misturada em 0,4 ml da amostra. Quanto à absorbância, foi realizada a leitura a 300 nm após 30 minutos de repouso na ausência de luz, usando como branco o metanol. O conteúdo total de flavonóides foi determinado usando uma curva padrão de quercetina em cinco concentrações (1, 5, 10, 20, 40 µg/ml). $Y=0,0198x+0,3552$, onde “ y ” é a absorbância e “ x ” é a concentração;

$R^2=0,9807$ (Anexo 2). O conteúdo total de flavonóides foi expresso como mg de equivalente de quercetina por grama de extrato de própolis, considerando o teor de extrato seco das mesmas, conforme descrito por Lee (2003).

Resíduo seco (sólidos solúveis em metanol)

Uma alíquota de 5 ml do extrato etanólico própolis, foi transferida para cápsula de porcelana seca (aquecida em estufa a 105°C, por 2 h, resfriada em dessecador e pesada) e o conjunto levado à estufa pré-aquecida a 105°C, onde permaneceu por 2 h. Após resfriamento em dessecador, o conjunto foi pesado. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de 1 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5 mg). Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de resíduo seco (sólidos solúveis em metanol) calculado pela razão entre a massa de resíduo depositada no cadinho e a massa inicial da própolis bruta extraída, correspondente à alíquota de 5 mL, conforme descrito por Instituto Adolfo Lutz (1976); Brasil (2001); European (2002).

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

O sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) consistiu em duas bombas de solvente modelo SCL-10Avp, equipado com um detector com arranjo de diodos SPD20 (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um injetor do tipo Rheodyne 7125i com um loop de capacidade para 20 μ L. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna C-18 (25 cm x 4.6 mm x 5 μ m, Shimpack CLC-ODS), pré-coluna C-18 SULPELCO 4,0 mm. Para as análises dos flavonóides foi usado água:ácido fórmico (99:1, solvente A) e Metanol (Solvente B) como fase móvel e para os derivados de ácidos foi usado água:ácido fórmico (95:5, solvente A) e Metanol (Solvente B). A condição cromatográfica foi: 0-15 min 20% B, 15-20 min 30% B, 20-30 min 40% B, 30-40 min 40% B, com o fluxo de 1.0 ml/min. Para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 290 nm e temperatura de 40 °C (DALMORA, et. al., 1997).

Análise Estatística

Foram realizadas análises de significância das amostras a 1% e 5%, utilizando o software modelo Proc Gun do SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de própolis apresentaram atividade antimicrobiana sobre a cepa clínica de MRSA e ATCC. Foram testadas três amostras multi-resistentes, sendo uma de MRSA e duas de ATCC, identificadas como ATCC 6538 e ATCC 25923, sendo que as três apresentaram atividade para as duas própolis na concentração de 68,7 µg/mL, demonstrando uma atividade de 100% para as amostras analisadas.

De acordo com Cos et al. (2006) é de fundamental importância que nos testes de atividade antimicrobiana de produtos naturais, sejam avaliadas cepas de referência multirresistentes, como as avaliados no presente estudo.

Da mesma forma, para análise da atividade antibacteriana da própolis, foram utilizados 77 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina, das quais, 70/77 (90,9%) foram sensíveis a própolis A e 64/77 (83,1%) foram sensíveis a própolis B (figura 1). Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Loguercio et al. (2006), onde a sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivo foi de cerca de 94,4% frente ao extrato etanólico de própolis. Concordando também com os resultados de Coelho et al. (2010) que encontraram uma sensibilidade de 90,5% para o extrato de própolis em animais com mastite. Também Funari (2006) com uma sensibilidade de 94% para isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite, assim como os estudos de Trusheva et al., 2010, encontraram atividade antibacteriana significativa de mais de 90% em um extrato de própolis iraniano.

A atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas está relacionada à presença de ingredientes ativos, sendo a própolis mais efetiva contra os microrganismos Gram-positivos porém apresentam alguma atividade em Gram-negativos (MIRZOEVA et al., 1997, KUJUMGIEV, et. al., 1999). A razão para isto ainda não é bem conhecida, contudo, Vargas

et. al. (2004), acreditam que apesar das Gram-negativas apresentarem uma parede mais delgada sua constituição mais complexa e a presença de um alto teor de lipídeos, possivelmente provoque uma maior resistência de bactérias Gram-negativas a extratos etanólicos de própolis.

No teste para avaliar a CBM obteve-se 68,7 µg/ml, para 22/77 (31,4%) das amostras testadas frente a própolis A. Por outro lado, a concentração obtida no menor número de isolados de *Staphylococcus* spp. foi de 8,6 µg/ml com 2/77 (2,8%) dos isolados também para própolis A. Para própolis B o maior número de isolados foi encontrado na concentração de 137,5µg/ml, para 36/77 (46,7%) e o menor número foi encontrado na concentrações de 17,1µg/ml, 4,3 µg/ml e 2,1 µg/ml, com 1/77 amostra cada um (1,3%). Estes resultados estão representados na tabela 1. Quando comparados o números de isolados com CBM maior ou igual a 68,7 µg/ml verificou-se um maior número de isolados para a própolis B 57/77 (74,02%) do que para a própolis A 37/77 (48,05%), indicando assim que a própolis A foi ativa numa menor concentração. Sendo que para Cos et. al.(2006), a concentração ideal estaria entre 100-150µg/ml sugerindo uma menor eficiência quando comparada aos dados do presente estudo. Assim como Lilkenbaun e Barbosa (1994), que encontraram concentrações entre 126,23µg/ml a 185,7µg/ml, muito inferior a concentração obtida para a própolis A. Assim como as concentrações encontradas por Santos et al. (2002), que foram de 64 e 256 µg/ml em um extrato proveniente de Minas Gerais, similar aos observados em nosso estudo. Contudo, Rhajaoui et al. (2001), encontraram uma concentração inibitória menor de 31µg/ml, para o extrato de própolis.

Tabela 1 – Concentração bactericida mínima (CBM) de isolados de *Staphylococcus* spp. frente a extrato etanólico de própolis

	n	Concentração Bactericida Mínima (µg/ml)											
		550	275	137,5	68,7	34,3	17,1	8,6	4,3	2,1	1,1	0,53	0,26
Ext A	77	0d	2d	13c	22a	19b	12c	2d	0d	0d	0d	0d	0d
Ext B	77	0e	2d	36a	19b	4c	1e	0e	1e	1e	0e	0e	0e

(a, b, c, d, e, melhor tratamento em ordem crescente)

No presente estudo, 15 isolados foram resistentes à oxacilina. Nestes, a sensibilidade a própolis também foi menor. Este fato pode estar relacionado a alterações na parede celular, freqüentemente associados a multirresistência

em *Staphylococcus* spp (BOSIO 2000; GRANGE et al., 2005; UZEL et al., 2005). Da mesma forma têm sido comprovados que a própolis, em particular a presença dos flavonóides, aumentam a atividade de certas drogas antimicrobianas, em especial os beta lactâmicos (STAPLETON et al., 2004). A atividade dos flavonóides simultânea com os beta lactâmicos pode estar associada a alterações estruturais na PBP2a, inibição de β -lactamases, inibição do mecanismo de efluxo, desestabilização da membrana citoplasmática e inibição da topoisomerase (LECHNER et al., 2008; LIU et al., 2009; EUMKEB et al., 2010; FUJITA et al.; 2005; KUSUDA et al., 2006). Dessa forma observa-se na figura 1, uma sensibilidade simultânea entre os extratos etanólico de própolis e à oxacilina. As amostras que foram resistentes à própolis também se demonstraram resistentes a oxacilina, ao passo que, os microrganismos sensíveis a própolis também foram sensíveis a oxacilina. Estudos futuros poderão ser realizados efetivando combinação entre antimicrobianos e própolis, a fim de, testar a eficácia das substâncias (SILVA et al., 2005).

Atualmente os produtos naturais representam uma fonte importante de antimicrobianos, visando principalmente suplantar a resistência bacteriana, com a descoberta de produtos naturais bioativos, que venham substituir os antimicrobianos convencionais que não são mais tão eficazes frente a isolados bacterianos (SILVEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2005; SUFFREDINI et al., 2006).

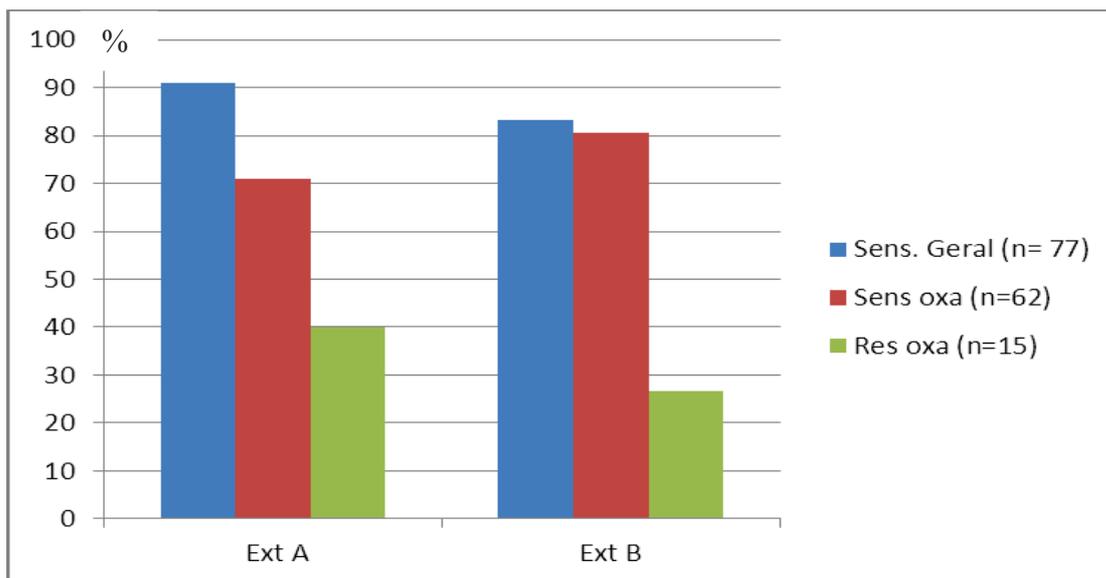


Figura 1 – Atividade antimicrobiana das própolis sobre os isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de mastite em bovinos e sensíveis e resistentes a oxacilina.

Estudos realizados *in vitro* com própolis vêm demonstrando sua intensa atividade antimicrobiana, principalmente pela presença de compostos flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres (FREITAS et al., 2005; PINTO et al., 2001). Os teores encontrados de fenólicos totais e flavonóides totais nas duas amostras de própolis comercial foi de 126,22 mg (12,62%) para o extrato A e 73,12 mg (7,31%) para o extrato B equivalente de ácido gálico por grama de extrato de própolis, e de 51,06 mg (5,10%) para o extrato A e 17,45mg (1,74%) para o extrato B equivalente de quercetina por grama de extrato de própolis de acordo com os limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), com um percentual mínimo de fenólicos totais %de 5% e um percentual mínimo de flavonóides totais de 0,5% (BRASIL, 2001) (Tabela 2). Esses resultados corroboram com o estudo de Ashraf e Bassuony (2009), que também encontraram compostos fenólicos e flavonóides em amostras de própolis do Egito. As concentrações de fenólicos totais e flavonóides totais variam em decorrência de diferentes fatores, que envolvem; ecologia da flora (PARK et al., 2002), pelo período de coleta da resina (ROCHA et al., 2003), pela genética da abelha rainha (PARK et al., 1998), da flora local e região de coleta, entre outros (BANKOVA, 2005; SOUSA et al., 2007). Os valores encontrados neste trabalho estão dentro dos padrões determinados por outros autores, sendo que os valores de flavonóides totais foram menores que o de

fenólicos totais (MOREIRA et al., 2008, KALOGEROPOULOS, et al., 2009). O perfil cromatográfico para as amostras de própolis são semelhantes, apresentando compostos fenólicos. Pelos espectros de UV obtidos é possível sugerir que os principais picos podem ser derivados de ácidos cinâmicos, ou seja, o pico de coloração azul representando a intensidade de ácido cinâmico para a própolis A, sendo que, o pico de coloração rosa representando a intensidade de ácido cinâmico para a própolis B (Anexo 3). Presume-se que o ácido cinâmico esteja diretamente ligado a atividade antimicrobiana da própolis, já que a própolis brasileira apresenta um maior predomínio de ácidos fenólicos em relação aos flavonóides, encontrando comumente derivados de ácidos cinâmicos (BANKOVA, 2005, POPOVA et. al., 2005, SFORCIN, 2007)

Tabela 2- Resultados da análise de fenóis e flavonoides totais e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Análise	Teor(%)A	Média/ desvio padrão A	Teor(%)B	Média/desvio padrão B	Requisito do MAPA
Fenólicos totais	12,62%, 12,63%, 12,61%	12,62%±0,01	7,31%, 7,32%, 7,30%	7,31%±0,01	Mínimo de 5,0%
Flavonóides totais	5,12%, 5,10%, 5,08%	5,10%±0,02	1,76%, 1,74%, 1,72%	1,74%±0,02	Mínimo de 0,5%

O teor de resíduo seco foi representado pelos seguintes percentuais: 11,52% do extrato A e 10,37% do extrato B de matéria seca. Sendo esses resultados imprescindíveis para determinação do teor de fenóis e compostos flavonóides nas amostras de extrato etanólico comercial de própolis.

Estatisticamente as amostras testadas com o extrato de própolis A foram significativas em nível de 1% pois $p < 0,01$, assim como também foi significativo em nível de 5%, pois $p < 0,05$. Sendo o melhor tratamento o quatro 22/77 amostras e os piores tratamentos o dois e sete com 2/77 amostras. Ou seja, letras diferentes significam padrões estatísticos diferentes. Os tratamentos representados na tabela 1.

As amostras testadas com o extrato de própolis B foram significativas em nível de 1% pois $p < 0,01$, assim como também foi significativo em nível de 5%, pois $p < 0,05$. Sendo que o melhor tratamento é o três com 36/77 amostras

e os piores tratamentos foram o seis, oito e nove com 1/77 amostra, pois letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as amostras. Os tratamentos estão representados na tabela 1.

CONCLUSÃO

Caracteriza-se uma alta sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite bovina quando tratados com extrato etanólico de própolis.

Há relação entre a sensibilidade a própolis e a sensibilidade a oxacilina.

Os extratos de própolis são ativos contra as amostras de referência utilizadas (isolado clínico de MRSA e ATCC 6538 e ATCC 25923).

Os extratos das própolis (A e B) são mais eficazes sobre isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis a oxacilina, apontando para um sinergismo de efeito entre estes compostos.

A composição química está dentro dos padrões estabelecidos, pois os compostos fenólicos e flavonóides estão diretamente ligados às atividades antioxidantes e antimicrobianas da própolis.

Demonstra-se que a própolis é um ótimo antimicrobiano no combate de microrganismos patogênicos em especial *Staphylococcus* spp. e por se tratar de um fitoterápico não deixa resíduos, como os antibióticos convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHRAF, A., BASSUONY, E., New prenylated compound from egyptian própolis whit antimicrobial activity. **Rev. Latinoamer Química** v. 37, 2009.

BANKOVA, V.J. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization **J. Ethnopharmacol**, v.100, p.114, 2005.

BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **J. of Chromatography**, v.242, p.135-143, 1995.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C. TURCK, M. Antibiotic susceptibility tests by a standardized single disk method. **American J. of Clinical Pathology**, v.45, n. 4, p.493-496, 1966

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

BOSIO, K. et al. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **L. Appl Microbiol**, v.31, n.3, p.174-177, 2000.

BRANT, M.C.; FIGUEIREDO, J.B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, p.595-606, 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of concept'. **J. Ethnopharmacol.**, v. 106, p. 290–302, 2006.

COELHO, M. de S., SILVA, J.HV. da, OLIVEIRA, E.R.A de, AMÂNCIO, A.L.L., SILVA, N.V. da, LIMA, R.M.B. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Arch Zootec**, v.59, p.96, 2010.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standards. **Document CLSI M7-A7**, CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2006.

CULLOR, J. S., TYLER, J. W., SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**. São Paulo, v.2, p.1041-1060, 1994.

CRISAN, I.; ZAHARIA, C.N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCALU, C.; MUTIU, A.; PETRESCU, A. Natural propolis extract Nivcrisol in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **R. Journal of Virology**, v.46, p.115-133, 1995.

DALMORA, S., OLIVEIRA, J.E., AFFONSO, R., GIMBO E., RIBELA M.TC.P., BARTOLINI P., Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J. Chromatogr.** p. 199-210, 1997.

EUMKEB G., SAKDARAT S., SIRIWONG S., Reversing-lactam antibioticresistance of *Staphylococcus aureus* with galanginfrom *Alpinia officinarum* Hance and synergism withceftazidime. **Phytomedicine**, v.18: p.40–45, 2010.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA.**Strasbourg: Council of Europe**, ed.04, 2002.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. São Paulo: **Lemos Editorial**, p.175. 2000.

FREITAS, M.F.L., PINHEIRO JUNIOR, L.W., STAMFORD, T.L.M., RABELO, S.S. de A., SILVA, D.R. da, SILVEIRA FILHO, V.M. da, SANTOS, F.G.B., SENA, M.J. de, MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro *staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v.72, n.02, p.171-177, 2005.

FUJITA M., SHIOTA S., KURODA T., HATANO T., YOSHIDA T., MIZUSHIMA T., Remarkable synergiesbetweenbaicaleinandtetracycline,andbaicalein and -lactams againstmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiol Immunol** v.49, p.391–396, 2005.

FUNARI, C.S. e FERRO, V.O. Análise de própolis. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.26, p. 171-178, 2006.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J. of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990. Scazzocchio et al., Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine** v.25, p.1250-1256, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção pecuária 2007. **IBGE**, Riode Janeiro, 2007. Disponível em: www.ibge.gov.br.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas** analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, **Instituto Adolfo Lutz**, métodos químicos e físicos para análise de alimentos, ed.02, v.01, 1976.

KALOGEROPOULOS, N., KONTELES, S.J., TROULLIDOU, E., MOURTZINOS, I., KARATHANOS, V.T., **F. Chemistry**, v.116, p.452, 2009.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **A. Environ. Microbiol.** v.46, p.165-170, 1983.

KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p. 235-240, 1999.

KUSUDA M., INADA K., OGAWA T.O., YOSHIDA ,SHIOTA S.,TSUCHIYA T.,etal.Polyphenolic constituent structures of Zanthoxylum piperitum fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.70:p.1423–1431, 2006.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, S. R. C.; CHANDE, C. G.; NEVES, I. R.; LISTONI, F. J. P. Efeito antimicrobiano in vitro da propolis. In: CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994, Rio Cuarto. **Anais**. Rio Cuarto, Argentina, p.189-192, 1994.

LEE, Y.K.P., YANG, M.I., MISCHENCO, B.A., BAUN Y.X., HU, H.L., HUANG, W.J., BARAN, A.J. Use of circular cylinders as surrogates for hexagonal pristine ice crystals in scattering calculations of infrared wavelengths v.42, p. 2653-2664, 2003.

LECHNER D., GIBBONS S., BUCAR F. Plantphenolic compounds as ethidiumbro-mide effluxinhibitorsin *Mycobacterium smegmatis*. **J. Antimicrob Chemother** , v. 62, p.345–348, 2008.

LENETTE, EH; BALOWS, A.; HAUSLER, WJ; SHADOMY HJ – Manual of Clinical Microbiology. **A. Society for Microbiology**, Washington, D.C., 1985.

LILENBAUM W., BARBOSA A.V., Avaliação da atividade antimicrobiana da própolis perante *Malassezia pachydermatis in vitro*, **Rev. Bras. Med. Vet**, v. 16, p. 248-251, 1994.

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

LIU M.H., OTSUKA N., NOYORI K., SHIOTA S., OGAWA W., KURODA T., et.al. Synergistic effect ofkaempferolglycosidespurifiedfrom *Laurus nobilis* and fluoro- quinolones onmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biol Pharm Bull**, v.32,p.489–492, 2009.

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A . B. A. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias, Uberlândia**, v.5, n.1, p.107-118. 1999.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

MOREIRA, L., DIAS, L.G., PEREIRA, J.A., ESTEVINHO, L. Food and Chemical Toxicology, v.46, p.3482, 2008.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne: **NCCLS**, p.133, 2002.

PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., SCAMPARINE, A.R.P., AGUIAR, C.L. **Ciência Rural**, v.02, p. 997, 2002.

PARK, Y.I.A., IKEGAKI, M., ABREU, J.A.S., ALCICI, N.M.F. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.313, 1998.

PEDRINI , S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E. de; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. 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, p.278-283, 2001.

POPOVA, M., SILICI, S., KAFTANOGLU, O., BANKOVA, V. Antibacterial activity of turkish and propolis its qualitative e quantitative chemical composition, **Phytomedicine**, v. 12, p. 221-228, 2005.

RHAJAOU, M.; OURMAZIL, H.; FAID, M.; LYAGOUBI, M.; ELYACHIOU, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial activity of a Moroccan própolis extracts. **Science Letters**, v.3 n.3 2001

ROCHA, L., DOS SANTOS, L.R., ARCENIO, F., CARVALHO, E.S., LUCIO, E.M.R.A., ARAÚJO, G.L., TEIXEIRA, L.A., SHARAPIN, N. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.13, p.71, 2003.

ROESLER, R., MALTA, L.G., CARRASCO, L.C., HOLANDA, R.B., SOUSA C.A.S., PASTORE, GM. Atividade antioxidante de frutos do cerrado. **Revista brasileira de ciência e tecnologia de alimentos**, v.27, p.53-60, 2007.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A.; BRAGA, F.C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J. of Ethnopharmacology**, v. 80, p.1-7, 2002.

SILVA, M.T.G, SIMAS S.M., BATISTA, T.G.F.M., CARDARELLI, P., TOMASSINI, T.C.B., Studies on antimicrobial activity in vitro of *Physalis angulata* (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n.7, p.779-782, 2005.

SILVEIRA, G.P., NOME, F., GESSER, J.C., SÁ, M.M., TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química nova**, v. 29, n.4, p. 844-855, 2006.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. A.; NADER FILHO, F. A.; AVILA G. P. C. Sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positiva, isolados em casos de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.12, n.1, p. 57-63, 1996.

SUFFREDINI, I.B., PACIÊNCIA, M.L.B., NEPOMUCENO, D.C., YOUNES, R.N., VARELLA, A.D. Antibacterial and cytotoxic activity and Brazilian plant extracts Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 287-290, 2006.

SOUSA, J.P.B., FURTADO, N.A.J.C., JORGE, R., SOARES, A.E.E., BASTOS, J.K. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.17, p.85, 2007.

SFORCIN, J.M., Própolis and the immune system: A Review, **J. of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.

SWAINT, T., HILLS, W.T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **J. of the Science of Food and Agriculture**, London, v.10, p.135-144, 1959.

STAPLETON P.D., SHAH S., ANDERSON J. C., HARA Y., HAMILTON-MILLER J.M.T., TAYLOR P. W. Modulation of-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **IntJ Antimicrob Agents** v. 23, p.462–467, 2004.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **R. da Sociedade Bras. de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 281-301, 2000.

TRUSHEVA, B., TODOROV, I., NINOVA, M., NAJDENSKI, H., DANESHMAND, A., BANKOVA, V., Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis, **Chemistry Central Journal**, 2010.

UZEL A, SORKUN K, ÖNÇAG Ö, ÇOGULO D, GENÇAY Ö, SALIH B. **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples**. *Microbiol Res* 160: 189-195, 2005

VARGAS, A.C., LOGUERCIO, A.P., WITTI N.M., et. al. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n.1, p. 159-163, 2004.

VIANNI, M.C.E., LÁZARO, N.S. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isolados de mastite subclínica bubalina. **Pesq. Veterin. Bras.** n.23, p.47-51. 2003.

5. Considerações Finais

Os isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite bovina demonstraram uma grande sensibilidade aos extratos etanólicos de própolis. Os extratos de própolis foram ativos contra as amostras de referência utilizadas (isolado clínico de MRSA e ATCC 6538 e 25923)

Os extratos das própolis (A e B) foram mais eficazes sobre isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis à oxacilina, apontando para uma ação simultânea entre os compostos analisados.

A composição química das própolis analisadas está dentro dos padrões estabelecidos. Sendo evidenciado que os compostos fenólicos e flavonóides, os quais estão diretamente ligados as atividades antioxidantes e antimicrobianas da própolis.

A própolis apresenta um grande potencial antimicrobiano no combate de microrganismos patogênicos em especial *Staphylococcus* e por se tratar de um fitoterápico não deixa resíduos tóxicos a saúde pública, além de não representar riscos para o meio ambiente, como os antimicrobianos convencionais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **J. of Chromatography**, v.242, p.135-143, 1995.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIK, I.; KADOTA, S., Chemical constituents of Brazilian própolis and their cytotoxic activities. **J. Nat.**, p.896, 1998.

BISHOP, J.R., BODINE, A.B, ODEELL, G.D. Retention data for antibiotics commonly used for bovine infections. **J. Dairy Science.**, v.67, p.537-540, 1984.

BONAN, K.; COHEN, Y. Comer com inteligência. La revolución de La medicina ortomolecular que descubre los alimentos esenciales para cada individualidad e estilo de vida. **Ed. Sudamericana**, Buenos Aires, Argentina, 1992.

BONTEMPO, M. Mel. Uma vida doce e saudável. São Paulo: **Aláude Editorial**, p. 149, 2008.

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

BOYLE-VAVRA, S.; YIN, S.; CHALLAPALLI, M.; DAUM R. Transcriptional Induction of the Penicillin-Binding Protein 2 Gene in Staphylococcus aureus by Cell Wall-Active Antibiotics Oxacillin and Vancomycin. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, v. 47, p. 1028-1036. 2003.

BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A.; GRAY, J.I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. **J. of Animal Science**. v. 73, p. 122-130, 1995.

BURATTI S., S. BENEDETTI, COSIO M.S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**, v.71, p. 1387-1392, 2007.

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

CABRAL, I.R.S.; et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**. v. 6, n.32, p. 1523-1527, 2008.

CASTALDO S, CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 2002.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SANCHEZ, A. e CORRALLES, C.J. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**. V.79, p.273-283, 2007.

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

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. Dairy microbiology. New York: **Applied Science**, v. 1, p. 119-163 1981.

COVA, W.G. Prática Sensitiva de Detecção de Penicilina no Leite. **Higiene Alimentar**,V.3, n.2, p.100-112, 1984.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J. Antimicrob Agents**. v. 26, p. 343-356, 2005.

CRANE, E. The past and present importance of bee products to man. **Plenum Press**, New York, p.1-14, 1997.

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

DROBROWOLSK, J.W., et al. Antibacterial, antifungal, antimobec, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J. of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 35, p. 77-82, 1991.

EDMONDSON, P.W. Strategies for producing high quality milk. **Anais do 2º Congresso Pan-americano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite**, Ribeirão Preto, Brasil, p. 70-78, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo, SP. **Atheneu**, v.2 4ª ed, p. 268, 2005.

FERNANDES Jr.A., SUGIZAKI, M.F., FOGO, M.L. et al. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **J. of Venomous Animals and Toxins**, v.1, n.2, p.1-5, 1995.

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

KATAYAMA, Y., ZHANG, Z.; CAMBERS, F. PBP 2a Mutations Producing Very-High-Level Resistance to Beta-Lactams. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, v.48, p. 453-459. 2004.

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

GORDIEN AY, GRAY AI, FRANZBLAU SG, SEIDEL V. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). **J. Ethnopharmacol** p. 500–505, 2009.

GRAAF, T., DWINGER, R.H. Estimation of milk production losses due to subclinical mastitis in dairy cattle in Costa Rica. **Preventive Veterinary Medicine**, v.26,n.3-4, p. 215 – 222, 1996.

HALLIWEL, B. The antioxidant paradox. **The lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWEL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids , tocopherols, tocotrienols and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **A. J. of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 268-275, 1995.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **J. of Dairy Science**, v. 77, n.7, p.2103 – 2112, 1994.

HOGAN, J.S., SMITH, K.L. A practical look at environmental. **NATIONAL MASTITIS COUNCIL**, p. 342, 1997 (<http://www.nmconline.org>).

HULIN, V. et al. Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sciences des Aliments**, v. 18, p. 563-582, 1998.

IBANEZ, E.; CIFUENTE, A. New analytical techniques in food Science. **Crit. Rev. Food Sci.**, v.41, p. 413-450, 2000.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção pecuária . **IBGE**, Riode Janeiro, 2007. Disponível em: www.ibge.gov.br.

ISLA, M.I. et al. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **J. of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 165-170, 2001.

JOHNSSON, G. Swedish scheme for the control of inhibitory substances. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.283, p. 59, 1993.

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

KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V.,CHRISTOV, R., POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p. 235-240, 1999.

KORHONEN, H., KAARTINEN, L. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: SANDHOLM, M., HONKANEN-BUZALSKI, T., KAARTINEN, L., PYORALA, S. The bovine udder and mastitis. Helsinki, **University of Helsinki-Faculty of Veterinary Medicine**, p.76-82, 1995.

KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., PIETSZ, G., CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel Forschung**, v.43, n.5, p.607-609,1993.

LADEIRA S.R.L, RIET-CORREA F., SHILD A.L., LEMOS R.A.A. BORGES J.R.J. Mastite bovina, Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. **Editora Pallotti, Santa Maria**, Vol.1, 3ª ed , p.359-370, 2007.

LEE, L.; CHEN, Y.; CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **Int. J. of Food Microbiology**. Taipei, v. 102, n. 2, p. 213-220, 2005.

LEVISON, W. & JAWETZ, E. Microbiologia médica e imunologia. Porto Alegre: **Artmed**, 4. ed., p.415, 1998.

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

MAKASHVILI, Z.A. De la historia de la utilizacion del propoleos . In: COMISION PERMANENTE DE TECNOLOGIA Y UTILLAJE APICOLAS. Un valioso producto de la apicultura: Propoleos – Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos, **Bucarest**: . p. 7-8, 1975.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, V.19, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M. C. Própolis: Chemical composition biological properties and therapeutic activity. **Apidologie** , V 26, p. 83-99, 1995.

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

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B.A.; SOUSA, M. I.; EURIDES, D.; LANGONI, H. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias**, v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.

MERESTA, L., MERESTA, T., BURDZINSKI, J., CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using na extract of propolis. **Medycyna Weterynaryjna**, v.45, n.7, p.392-395, 1989.

MERESTA, L., MERESTA, T. Antibacterial activity of flavonoid compounds of propolis, occuring in flora in Poland. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.28-29, n.1-4, p.61-63, 1985.

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

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

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

MIORIN, P.L. et al. Ant-bacterial acitivity of honey and propolis from *Apis mellifera* e *Tetragonista angustia* against *Staphylococcus aureus*. **J. of applied Microbiology**. v. 95, p. 913-920, 2003.

MOREIRA, E.A.M.; SHAMI, N.J.I.E. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. de Nutrição**. v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

NAGAI, T.; et al. Characterizacion of honey from different floral species. Its functional propreties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chemistry**. v. 97, p. 256-262, 2006.

NAGAI, T.; INOUE, R. Pepration and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. **Food Chemistry**, v. 84, p. 181-186, 2004.

NAGAI, T. et al. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chemistry**, v. 75, p. 237-240, 2001.

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

OLIVEIRA, C.M.C., SOUSA M.G.S., SILVA e SIVA da N., MENDONÇA C.L., SILVEIRA J.A.S., OIAGEN R.P., ANDRADE S.J.T., BARBOSA J.D., Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará, **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, p. 104 – 110, 2011.

OTA C, UNTERKIRCHER C, FANTINATO V, SHIMIZU MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses** p. 375–378, 2001.

PARADISI, F.; CORTI, G.; SBARAGLI, S.; et al. Effect of antibiotic pretreatment on resistance. **Seminars in respiratory infctions**. v. 17, n. 3, p. 240-245, 2002.

PARKY, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L., Própolis produzido no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, V.32, n.6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F., Evolution of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honey Bee Science**, Japão, V.21, n.2, p.85-90, 2000.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABDE, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. e ROSALEN, P.L., Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, New York, V.36, n.1, p.24-28, 1998.

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

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C., Vencendo a luta contra a mastite. Piracicaba: **Westfalia Surge/ Westfalia Landtechnik do Brasil**, 188p, 2002.

PIMENTA, C.P., REIS, C., SOUZA V.M., Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Rev. De Patologia Tropical**, v. 34, p. 27-36, 2005.

PINTO, M.S. Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite. Viçosa, G: UFV. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)–Universidade Federal de Viçosa**, p, 92, 2000.

PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **J. Food Sci.**, v. 29, p. 1720-1722, 1979.

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

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

RADOSTITS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. Herd health. **Food Animal Production Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders , ed. 2, p. 631, 1994.

REBHUN W.C. Doenças do Gado Leiteiro. **Roca**, São Paulo, p.339-377, 2000.

RENEAU, J.K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. **J. Dairy Science**, v.69, p.1708 – 1720, 1986.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Review Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SANTOS, F.G.B., MOTA, R.A., SILVEIRA-FILHO, V.M., SOUZA, H.M., OLIVEIRA, M.B.M, JOHNER, J.M.Q., LEAL, N.C., ALMEIDA, A.M.P., LEAL-ALBINO, T.C. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do Estado de Pernambuco. **R. Nappgama**, São Paulo, v.6, n.1, p.19-23, 2003.

SANTOS, C.R., ARAÚJO, G.L., CARVALHO, E.S., SHARAPIN, N., ROCHA, L.M., TEIXEIRA, L.A. Controle de qualidade físico-químico e biológico de tinturas de própolis. **Rev. da Universidade de Franca**, n.7, p.35, 1999.

SANTOS, B. M., & TANAKA, A. M. V. em portadores são os de diferentes categorias de enfermagem do HC-FMRP/USP: fagótipos e resistência a antibióticos. **Geneva: WHO**, 1990.

SILVA, M.S.A., et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. Sobre bactérias orais planctônicas. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 02, p. 236-240, 2008.

SILVA, T. G. F da; TURCO, S. H. N.; ZOLNIER, S.; MOURA. S. B. de; SÁ, I. I. S. Variação Regional do Declínio da Produção de Leite no Período do Verão no Estado de Pernambuco. **Rev. Engenharia na Agricultura.**, 2008

SIROHI, S.; MICHAELAWA, A. Sufferer and cause: Indian livestock and climate change. **Climatic Change**, v.100, p.120-134, 2007.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental and observation leading to development of California Mastitis Test. **J. of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, V.130, n.5, p. 199-204, 1957.

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

SGARBIERI, V.C., Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades, degradação e modificação. São Paulo: **Varela**, 517p, 1996.

SMITH, B. Tratado de Medicina interna de grandes animais. São Paulo: **Manole**, V. 2, p. 1041-1056, 1994.

STOCKER, A. et al. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. **J. of Trace Elements in Medicine of Biology**, v. 19,. 183-189, 2005.

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

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 281-301, 2000.

TSAKOFF, T. Study of the local anaesthetic characteristics of propolis and the their effect in operations on sheep and dogs. **Apimondia**, Bucharest, p. 67-71, 1978.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, p. 41-66, 1988.

WESTON, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v.71, p. 235-239, 2000.

VANCRAEYNST, D.; HERMANS K. MARTEL, A.; ;VANECHOVTE, M.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphylococcus aureus* Strains from rabbits. **Veterinary Microbiology**. V.101, P.245-251, 2004.

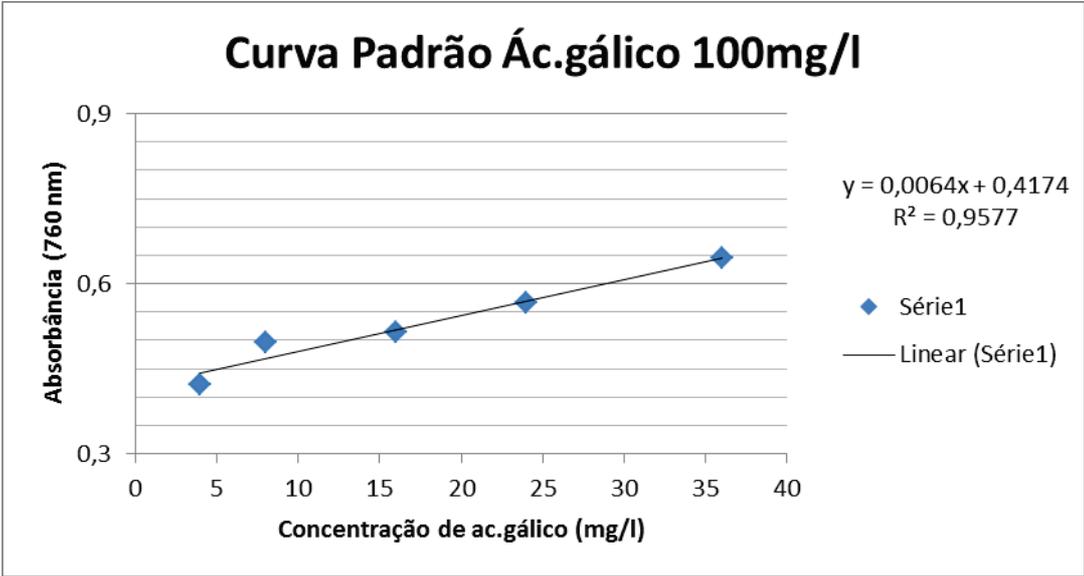
VALDES, G. Determinacion preliminar de la calidad antibacteriana de dos muestras de propóleo de Chile. **La Habana**, Cuba, 1996.

VARGAS, A.C., LOGUERCIO, A.P., WITTI N.M., et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n.1, p. 159-163, 2004.

VELOSO JÚNIOR, J. F. Análise da precipitação na microrregião “Brejo Paraibano” como suporte ao planejamento agrícola. Monografia (Graduação em Agronomia), Centro de Ciências Agrárias, **Universidade Federal da Paraíba**, 2000.

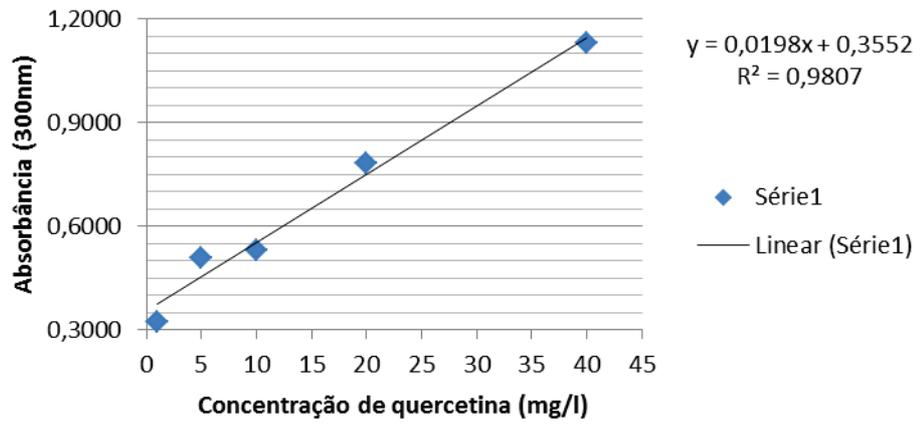
YILDIRIM Z, HACIEVLIYAGIL S, KUTLU NO, AYDIN NE, KURKCUOGLU M, IRAZ M, DURMAZ R. Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. **Pharmacol** p. 287–292, 2004.

ANEXO1
Curva Padrão de Ácido Gálico



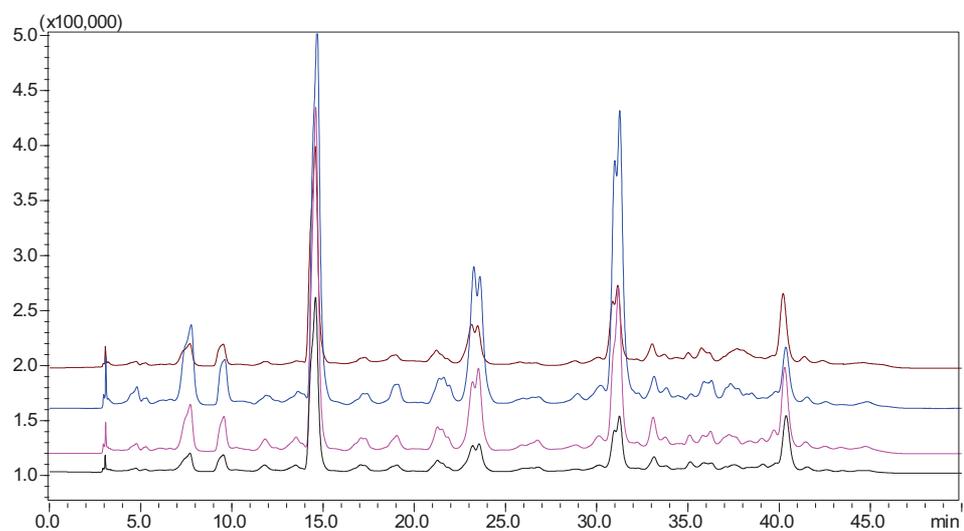
ANEXO 2
Curva Padrão de Quercetina

Curva Padrão de Quercetina 200 mg/l



ANEXO 3

Cromatograma do perfil dos compostos fenólicos (ácido cinâmico) da propolis da *Apis mellifera*. Cromatograma preto: Próplis A, azul, Própolis B, rosa: . Comprimento de onda 290 nm.



Cromatograma do perfil de compostos fenólicos em amostras de própolis A e B. Azul própolis A e Rosa própolis B.