

Samira de Aquino Leite Fiordalisi

EXTRATOS DE PRÓPOLIS NO TRATAMENTO DA MASTITE  
BOVINA: AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E DA VIABILIDADE CELULAR EM  
EXPLANTES DA GLÂNDULA MAMÁRIA

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Shirley Kuhn

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Luciana Aparecida Honorato

Florianópolis  
2014

Fiordalisi, Samira de Aquino Leite

Extratos de própolis no tratamento da mastite bovina: avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e da viabilidade celular em explantes da glândula mamária. / Samira de Aquino Leite Fiordalisi ; orientadora, Shirley Kuhnen ; coorientadora, Luciana Aparecida Honorato. - Florianópolis, SC, 2014.

84 p.

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

Inclui referências

1. Agroecossistemas. 2. Sanidade Animal. 3. Viabilidade celular. 4. Modelos Alternativos de Experimentação Animal. 5. Ação Antimicrobiana da Própolis. I. Kuhnen, Shirley. II. Honorato, Luciana Aparecida. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.



**“Extratos de própolis no tratamento da mastite bovina: avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e da viabilidade celular em explantes da glândula mamária”**


**Por**


**SAMIRA DE AQUINO LEITE FIORDALISI**


Dissertação julgada adequada, em 24 de outubro de 2014, e aprovada em sua forma final, pela Orientadora e pela Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas. Área de Concentração Agroecologia, no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias/UFSC.

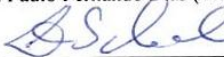
  
Prof. Dr. Ademir Antonio Cazella (Coordenador do Programa)

**Banca Examinadora:**

  
Dr<sup>a</sup> Luciana Aparecida Honorato, (Presidente /Coorientadora)

  
Dr<sup>a</sup> Daniele Cristina da Silva Kazama (Titular/PGA-UFSC)


  
Dr. Paulo Fernando Dias (Titular Externo/BEG-UFSC)

  
Dr. Luiz Filipe Damé Schuch (Titular Externo/UFPel)

**Orientadora:**

  
Dr<sup>a</sup> Shirley Kuhnen

**Candidata ao título:**

  
Samira de Aquino Leite Fiordalisi

Florianópolis, 24 de outubro de 2014



## AGRADEÇO...

... a Deus pela existência, pela saúde e por colocar em meu caminho pessoas especiais que fazem valer a pena todo o sacrifício da jornada.

... a minha família, em especial a minha mãe Maria Albertina, minha melhor amiga e principal incentivadora.

... a meu marido William, meu companheiro de caminhada, parceiro de todas as horas.

... a minha filha Luiza, a luz da minha vida e a razão do meu sorriso.

...as minhas orientadoras, Shirley e Luciana, por todo o conhecimento e por toda a compreensão, devo muito desta conquista ao trabalho e esforço de vocês. Obrigada por acreditarem em mim.

...a todos os meus amigos, que perto ou longe me encorajaram nesta empreitada.

...a fiel escudeira Amábile. Foram tantas horas de trabalho na câmara de fluxo, tantos litros de meio DMEM F12 preparados, tantos pacotes de material para autoclavar, tantos eppendorfs para pesar e tanto medo de isso tudo contaminar (rss)... esta vitória também é sua. Obrigada!

...aos parceiros de coleta Jhônatan, Vanessa, Vinicius e Keisy que foram fundamentais para o sucesso da pesquisa.

...aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Morfofisiologia Animal e Laboratório de Bioquímica e Morfofisiologia Vegetal, que fizeram todo o trabalho ser muito mais divertido.

...a Maria Beatriz, por toda a paciência e disponibilidade, por todas as conversas e dúvidas sanadas.

...aos colegas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em especial a Márcia Regina, por todo o cuidado, carinho e esforço para o sucesso dos ensaios antimicrobianos.

... a toda a equipe do Frigorífico Broering que sempre foram muito prestativos e dispostos a nos receber para coleta dos tecidos mamários.

...ao programa de Pós-graduação em Agroecossistemas por possibilitar-me a desenvolver uma pesquisa tão importante e pela oportunidade de cursar o doutorado neste programa.

... a CAPES por ter concedido a bolsa financiadora fundamental para a realização do mestrado.



Dedico esta conquista a aqueles  
que mais amo, Luiza, Maria e  
William.





“Virá o dia em que a matança de um animal será considerada um crime contra a humanidade”.  
(Leonardo da Vinci)

"Podemos julgar o coração de um homem pela forma como ele trata os animais". (Immanuel Kant)

“Quem maltrata um animal é alguém que ainda não aprendeu a amar”. (Chico Xavier)



## RESUMO

A mastite é a doença mais frequente e importante dos rebanhos leiteiros, afetando a qualidade e a produção do leite, podendo ainda acarretar na presença de resíduos de antibióticos no alimento. Por estas razões a descoberta de novos agentes preventivos ou terapêuticos tem sido justificada, destacando-se a busca na natureza. Nesse contexto, extratos de própolis são candidatos em potencial, uma vez que estão descritos na literatura como antimicrobianos, anti-inflamatórios, antifúngicos, entre outros. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de extratos de própolis de origens geográficas distintas, e determinar a viabilidade celular em explantes mamários bovinos após exposição a estes extratos. Foram testadas amostras de própolis dos municípios catarinenses de Água Doce, Urupema e São Joaquim e o extrato típico de Minas Gerais (própolis verde). A extração foi realizada com etanol 70% (1:10, p/v) por 24 h. Após a remoção do solvente em estufa a 60° C, os resíduos foram analisados pelos testes de Folin-Ciocalteu, reação com Cloreto de Alumínio e 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH). A atividade antimicrobiana foi determinada através da técnica de Pour Plate, após dois períodos de contato (6 e 24 h) com um inóculo de 10<sup>5</sup> UFC/mL de cepas padronizadas de *S. aureus* e *E. coli* e isolados de leite mastítico, utilizando diferentes concentrações dos extratos (de 0 à 1000 µg/mL). A citotoxicidade foi avaliada em explantes de glândula mamária bovina cultivadas em meio DMEM-F12, após exposição aos extratos de própolis, nas concentrações de 0, 17,5, 35, 70, 140, 280 e 560 µg/mL por 48 h. O teor de fenólicos não diferiu entre os extratos variando de 97,97 à 116,29 µg de EAG/mg (P<0,05). Contudo, houve maior conteúdo de flavonoides no extrato de Minas Gerais (15,91 µg de EQ/mg) e menor no de Urupema (7,33 µg de EQ/mg) (P<0,05). O extrato de Urupema apresentou também a menor atividade antioxidante, enquanto os demais não diferiram entre si (P<0,05). O crescimento de *S. aureus* foi reduzido após exposição aos extratos. Porém, sua eficácia foi dependente da origem da própolis e concentração. Os extratos de Urupema, Minas Gerais e São Joaquim reduziram o crescimento de *S. aureus* em 4 log<sub>10</sub> vezes a partir de 500 µg/mL e a zero na concentração de 1000 µg/mL. Por outro lado, houve fraca ação antimicrobiana sobre as cepas de *E. coli*. O extrato mineiro foi o único que reduziu o crescimento bacteriano em 2 log<sub>10</sub> na concentração de 500 µg/mL,

enquanto os demais apenas a partir de 750 µg/mL. O ensaio *in vitro* com explantes da glândula mamária bovina mostrou-se adequado para avaliação da citotoxicidade, não ocorrendo queda na viabilidade celular após 96 h de cultivo ( $P < 0,05$ ). Porém, a origem e a concentração da própolis afetaram a viabilidade do tecido mamário. O extrato de Água Doce mostrou a menor citotoxicidade às células do úbere bovino ( $P < 0,05$ ). Os valores de  $IC_{50}$  encontrados foram 272,4 µg/mL, 171,8 µg/mL, 63,85 µg/mL e 13,26 µg/mL para os extratos de Água Doce, Urupema, São Joaquim e Minas Gerais, respectivamente. Considerando-se que na concentração próxima do  $IC_{50}$ , o extrato de Urupema reduziu 1,2  $\log_{10}$  vezes o crescimento de *S. aureus*, este se destaca com maior potencial de uso no tratamento de mastite. Em conjunto, os resultados encontrados evidenciaram que a eficácia da própolis para o tratamento da mastite é dependente da sua origem. Além disso, verificou-se que as concentrações de maior atividade antimicrobiana mostraram-se prejudiciais à glândula mamária, restringindo o uso intramamário e justificando a necessidade de estudos futuros com nanoemulsões ou frações purificadas.

Palavra-chave: própolis, atividade antimicrobiana, viabilidade celular, explantes de glândula mamária, citotoxicidade de própolis.

## ABSTRACT

Mastitis is the most frequent and significant disease among dairy he affecting not only the production and quality of milk, but also causing antibiotic residues in the milk. As such, the discovery of new preventative agents or therapies are necessary, especially those coming from natural sources. In this context, propolis extracts are potential candidates as they are described in the literature as antimicrobial, anti-inflammatory, antifungal, among others. In the present study, the objective was to evaluate the antimicrobial activity of propolis extracts *in vitro* from distinct geographic locations and determine the cellular viability in bovine mammary explants after exposure to these extracts. Propolis extracts used in the study included samples from the municipalities of Agua Doce, Urupema, and São Joaquim in Santa Catarina State, and a typical extract from Minas Gerais State (green propolis). Extraction was realized with 70% ethanol (1:10, w/v) for 24 h. To remove the solvent, the solution was heated to 60° C, and the residue was then analysed using Folin-Ciocalteu test, Aluminium Chloride assay and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The antimicrobial activity was determined using the Pour Plate technique, after two contact periods (6 and 24 h) between an inoculum of 10<sup>5</sup> UFC/mL of standard strains and isolated from mastitic milk of *S. aureus* and *E. coli* treated with different concentrations of propolis extracts (from 0 to 1000 µg/mL). The cytotoxicity was evaluated in bovine mammary gland explants cultivated in DMEM-F12 medium, after exposure to propolis extracts in concentrations of 0, 17.5, 35, 70, 140, 280 and 560 µg/mL for 48 h. The level of phenolics did not differ between the extracts and ranged between 97.97 and 116.29 µg of GAE/mg (P<0.05). However, the greatest content of flavonoids were found in the extract from Minas Gerais (15.91 µg of Q-Eq/mg) and the lowest in the extract from Urupema (7.33 µg of Q-Eq/mg) (P<0.05). The extract from Urupema also presented the lowest antioxidant activity, while the others showed no differences between them (P<0.05). Growth of *S. aureus* was reduced after extract exposure. However, its efficacy was dependent on the origin of the propolis and the concentration. Extracts from Urupema, Minas Gerais, and São Joaquim reduced the growth of *S. aureus* by 4 log<sub>10</sub> times using a concentration of 500 µg/mL and growth was reduced to zero at a concentration of 1000 µg/mL. On the other hand, there was weak antimicrobial activity on the strains of *E. coli*. Only the extract from Minas Gerais reduced the bacteria growth by

2 log<sub>10</sub> times at a concentration of 500 µg/mL, while the others reduced bacteria growth only with concentrations at 750 µg/mL and greater. The *in vitro* tests with bovine mammary gland explants were adequate for the evaluation of cytotoxicity as there was no drop in cellular viability after 96 h of cultivation (P<0.05). However, the geographical origin and concentration of the propolis affected the viability of mammary tissue. The extract from Agua Doce showed the lowest cytotoxicity for bovine udder cells (P<0.05). The IC<sub>50</sub> values found were 272.4 µg/mL, 171.8 µg/mL, 63.85 µg/mL, and 13.26 µg/mL for extracts from Agua Doce, Urupema, São Joaquim, and Minas Gerais, respectively. Considering that at a concentration close to the IC<sub>50</sub> the Urupema extract reduced *S. aureus* growth by 1.2 log<sub>10</sub>, the potential for its use in treating mastitis is evident. The results showed that the efficacy of propolis for the treatment of mastitis is dependent on its geographical origin, which is related to its chemical composition. Furthermore, the results showed that concentrations that produce higher levels of antimicrobial activity are harmful to the mammary gland, restricting intramammary use and justifying the need for further studies with nano-emulsions or purified fractions.

**Keywords:** propolis; antimicrobial activity; cell viability; mammary gland explants; cytotoxicity of propolis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica dos municípios catarinenses onde foram coletadas as amostras de propolis.....	40
Figura 2. Própolis bruta produzida em (A) São Joaquim, (B) Água Doce, (C) Urupema e (D) Minas Gerais.....	41
Figura 3. Ensaio antimicrobianos: (A) Diferentes concentrações de própolis incubadas com cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> ; (B) Meio de cultivo para bactérias Agar Mueller Hinton; (C) Placas de Petri com <i>S. aureus</i> em crescimento; (D) Placas de Petri com <i>E. coli</i> em crescimento. ....	44
Figura 4. Coleta e preparação dos explantes da glândula mamária bovina: (A) assepsia da região alveolar a ser fragmentada, de um quarto de glândula mamária bovina cedido pelo frigorífico; (B) obtenção dos explantes em câmara de fluxo laminar; (C) Após a pesagem dos explantes, foi realizado o seu acondicionamento em placas de cultivo com 12 poços; (D) Explante acondicionados em placas de 12 poços com diferentes concentrações de extratos de própolis.....	45
Figura 5. Avaliação da Citotoxicidade dos extratos de própolis. (A) incubação dos explantes com meio acrescido de MTT (5mg/mL) ao abrigo da luz; (B) explantes corados pelos cristais de formazan; (C) retirada do meio de cultivo e adição de DMSO; (D) resultado da solubilização dos cristais de formazan pelo DMSO. ....	47
Figura 6. Redução logarítmica de crescimento de (A) <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e 2 isolados de campo e (B) <i>E. coli</i> ATCC 8739 e 2 isolados de campo (média $\pm$ desvio padrão), a partir de inóculo inicial de $10^5$ UFC/mL, frente a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis provenientes de 3 regiões de Santa Catarina e de própolis verde de Minas Gerais. Os valores médios representam a contagem realizada em 6 e 24 h de contato.....	54
Figura 7. Viabilidade dos explantes de glândula mamária bovina em função do tempo de cultivo. Resultados expressos em porcentagem de células viáveis ( $P < 0,05$ ). ....	60





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo médio* de fenólicos e flavonoides totais e determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis em estudo.....	49
Tabela 2. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL Log <sub>10</sub> ) de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e 2 isolados de campo (média ± desvio padrão), a partir de inóculo inicial de 10 <sup>5</sup> UFC/mL, frente a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis provenientes de três regiões de Santa Catarina e de própolis verde de Minas Gerais. ....	53
Tabela 3. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL Log <sub>10</sub> ) de <i>E. coli</i> ATCC 8739 e 2 isolados de campo (média ± desvio padrão), a partir de inóculo inicial de 10 <sup>5</sup> UFC/mL, frente a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis provenientes de 3 regiões de Santa Catarina e de própolis verde de Minas Gerais.....	57
Tabela 4. Viabilidade dos explantes da glândula mamária bovina* após exposição a diferentes concentrações de extratos de própolis de Minas Gerais, São Joaquim, Urupema e Água Doce por 48 horas.....	62
Tabela 5. Concentração Inibitória máxima (IC <sub>50</sub> ) dos extratos de própolis de Minas Gerais, São Joaquim, Urupema e Água Doce frente à explantes de glândula mamária bovina. ....	63



## LISTA DE ABREVIACÕES

ATCC- American Type Culture Collection (Coleção Americana Tipos de Culturas)  
BHI- Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro e Coração)  
BHT- Butylated Hydroxytoluene (Hidroxitolueno Butilado)  
CBT- Contagem Bacteriana Total  
CCA- Centro de Ciências Agrárias  
CCS- Contagem de Células Somáticas  
CEM- Células Epiteliais Mamárias  
CMT- California Mastitis Test (Teste Califórnia para Mastite)  
CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
DMSO- Dimetilsulfóxido  
DP- Desvio Padrão  
DPPH- 1,1-difenil-2-picrilidrazil  
EAG- Equivalentes em Ácido Gálico  
EH- Extrato Hidroalcoólico  
EPAGRI- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural  
EQ- Equivalentes em Quercetina  
FAASC- Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina  
FEPAGRO- Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária  
GLM- Generalized Linear Model (Modelo Linear Generalizado)  
IC<sub>50</sub>- Concentração Inibitória de 50%  
IN- Instrução Normativa  
LMBV- Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica Vegetal  
MAC-T- Mammary Alveolar Cell-T (Células Alveolares Mamárias T)  
MTT- Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil  
NO- Nitric Oxide (Óxido Nítrico)  
PBS- Phosphate Buffered Saline (Tampão de fosfato salino)  
PGF<sub>2α</sub>- Prostaglandinas  
PMNs- Células Polimorfonucleares  
SC- Santa Catarina  
TVS- Terapia de Vaca Seca  
UFC- Unidades Formadoras de Colônia  
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	28
3.1 Anatomia e fisiologia da glândula mamária bovina.....	28
3.2 Mastite.....	30
3.3 Estudos in vitro utilizando células da glândula mamária bovina	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Extração da Própolis.....	39
4.2 Caracterização Fitoquímica.....	41
4.2.1 Fenólicos Totais.....	41
4.2.2 Flavonoides .....	41
4.2.3 Atividade Antioxidante.....	42
4.3 Ensaio Antimicrobiano.....	42
4.3.1 Cepas.....	42
4.3.2 Padronização do Inóculo .....	42
4.3.3 Método de plaqueamento em profundidade (Pour Plate).....	43
4.4 Ensaios de viabilidade celular.....	44
4.4.1 Coleta e manipulação do material .....	44
4.5 Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
5.1 Análise Fitoquímica.....	49
5.2 Atividade Antimicrobiana.....	52
5.3 Ensaio com explantes da glândula mamária bovina.....	59
5.3.1 Viabilidade ao longo do tempo.....	59
5.3.2 Efeito dos extratos de própolis sobre a viabilidade dos explantes da glândula mamária bovina.....	60
6. CONCLUSÃO .....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67



## 1. INTRODUÇÃO

A mastite é a doença mais frequente em rebanhos leiteiros. Em termos econômicos também é a mais importante por ocasionar redução significativa da produção e acarretar em gastos elevados com medicamentos. Não menos importante é o problema de bem-estar pela dor e desconforto que causa ao animal.

No Brasil, a maior prevalência da doença é a forma subclínica, podendo representar, em algumas regiões, 95% do total de casos (Medeiros & Souza, 2009). Isto porque a falsa segurança, gerada pela inexistência de sinais externos contribui para o alastramento rápido da doença no rebanho (Fonseca & Santos, 2000). A mastite subclínica além de provocar perdas entre 25 a 43% na produção de leite tem consequências sobre a qualidade do alimento, acarretando na diminuição dos níveis de antioxidantes (Atakisi et al., 2010).

Um indicativo de inflamação e/ou infecção da glândula mamária amplamente utilizado é a contagem de células somáticas (CCS) no leite. A inadequação dos produtores de leite aos valores determinados pela IN51 que limitava o número de CCS em 400.000 células/mL e a substituição pela IN62 que aumentou este valor para 600.000, também demonstra a prevalência de mastite nos rebanhos leiteiros e a falta de controle da doença no nosso País.

Neste cenário, a presença de resíduos de antibióticos no leite é também preocupante. Em amostras de leite comercializadas no Paraná, por exemplo, 19% estavam contaminadas com resíduos dos antibióticos cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, estreptomicina e  $\beta$ -lactâmicos (Vieira et al., 2012). Dentre os problemas no uso de antibióticos no controle da mastite estão a ineficácia em muitos casos, a resistência bacteriana, o descarte prolongado do leite, bem como o custo elevado do tratamento (Mukherjee et al., 2005). Ainda, o consumo de doses sub-terapêuticas de antibióticos pela população induz à resistência crônica de microorganismos e inibe a multiplicação da microbiota natural, interferindo também na qualidade do leite e derivados.

Todavia, a terapia da vaca seca, que consiste no uso de antibióticos intramamários no intervalo entre lactações, é uma técnica reconhecida para curar, no período seco, as infecções ocorridas na lactação e prevenir novas infecções. Desde os anos 60, quando se iniciou sua recomendação, essa terapia passou a ser amplamente adotada (cerca de 75 a 99% dos produtores a utilizam), dependendo do país e, de fato, a incidência de infecções intramamárias no período seco é



significativamente menor quando essa terapia é utilizada (Robert et al, 2006). Contudo, apesar de ser uma opção para produtores convencionais, essa prática não é recomendada rotineiramente para produtores orgânicos (Müller et al, 2010). Além disso, a resistência crescente aos princípios antimicrobianos e seus resíduos na cadeia alimentar tem estimulado pesquisas por produtos naturais como substitutos aos químicos sintéticos. No que diz respeito à mastite, é importante destacar que se busca nos produtos, compostos com ações distintas, incluindo antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante e também imuno-estimulante.

Neste contexto, a própolis se destaca como uma candidata em potencial, uma vez que tem sido descrita na literatura como uma matriz complexa com propriedades terapêuticas distintas, tais como antimicrobiana (Lu et al., 2005; Silva et al., 2006; Santana et al., 2012; Loguercio et al., 2006; Miorin et al., 2003), antifúngica (Ghasem et al., 2007; Silici et al., 2006; Aguero et al., 2010), antioxidante (Ahn et al., 2007; Kalogeropoulos et al., 2009; Gregoris et al., 2012; Gulcin et al., 2010; Marquele et al., 2005), e também anti-inflamatória (Mirzoeva & Calder, 1996; Sayed et al., 2009; Borrelli et al., 2002 ; Pagliarone et al., 2009; Sforcin, 2007). Entretanto, é sabido que a composição da própolis difere em função de fatores, como o clima, a vegetação, a região e de características inerentes da própria abelha (Mirzoeva & Calder, 1996; Zeggio et al., 2012a,b). Desta forma, é de interesse estudos que, no seu desenvolvimento, considerem estes aspectos. Além disso, apesar de relatos de cura de mastite usando própolis intramamário (Mirolyubov e Barskov, 1980; Medeiros, 2001) há evidências de que o produto também cause reação inflamatória na glândula mamária (Pereira & Botteon, 2008). Portanto, antecedendo os testes *in vivo*, é importante a avaliação do seu potencial citotóxico frente às células do úbere bovino.

Diante do exposto, é de interesse o desenvolvimento de alternativas de controle sanitário, visando à substituição dos antimicrobianos convencionais, por produtos que possam ser utilizados de forma intramamária e sejam efetivos antimicrobianos, anti-inflamatórios e imuno-estimulantes. Desse modo, com a finalidade de uso no tratamento de mastite clínica e/ou subclínica e uso na terapia da vaca seca, extratos de própolis típicos do Estado de Santa Catarina e de Minas Gerais foram testados frente a bactérias causadoras de mastite (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e explantes da glândula mamária. Este trabalho relata, pela primeira vez na literatura, a avaliação da toxicidade *in vitro*

de extratos hidroalcoólicos de própolis sobre explantes de glândula mamária bovina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo geral***

Avaliar o potencial dos extratos de própolis, com composição química distinta, típicos de Santa Catarina e Minas Gerais no controle da mastite bovina através de testes *in vitro*.

### **2.2 *Objetivos específicos***

- ✓ Determinar os teores de fenólicos totais, flavonoides e a atividade antioxidante dos extratos de própolis produzidos nos municípios catarinenses de Água Doce, São Joaquim e Urupema, e de própolis verde típica do estado de Minas Gerais;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de própolis sobre cepa padrão e isolados de leite mastítico de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular dos explantes da glândula mamária bovina após 96 horas de cultivo para determinar a eficácia do modelo de estudo proposto;
- ✓ Determinar o efeito dos diferentes extratos de própolis sobre a viabilidade dos explantes da glândula mamária bovina.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Anatomia e fisiologia da glândula mamária bovina.*

As glândulas mamárias são glândulas sudoríparas modificadas com função de produzir leite para nutrição da prole. Elas têm origem no ectoderma embrionário, inicialmente representado por espessamentos paralelos, em pares, na superfície ventral do abdômen de forma contínua (Cunningham & Klein, 2008). Esta continuidade é quebrada conforme o número de botões mamários, no caso dos bovinos em número de quatro, de onde serão formadas as partes funcionais das glândulas mamárias. O crescimento, a diferenciação e as funções da glândula mamária estão sob o controle inerente do sistema endócrino que, por sua vez, responde a ação e interação de fatores estimulantes e inibitórios (Imagawa et al., 1994).

As células secretoras de leite, ou parênquima, se desenvolvem por meio de proliferação de uma única camada de células epiteliais que surgem do cordão mamário primário, estimuladas pelo lactogênio placentário. Por fim, as células epiteliais formam estruturas ocas e circulares chamadas alvéolos, que serão as unidades secretoras de leite (Dyce et al., 2010). Estes alvéolos se agrupam em unidades maiores denominadas lobos. Estas estruturas são recobertas por células contráteis de natureza mioepitelial, que também se localizam ao longo dos ductos e respondem ao reflexo de ejeção do leite. Simultaneamente, uma parte do epitélio se desenvolve formando o mamilo ou os tetos, que é conexão externa para o sistema interno de secreção de leite. O estroma da glândula mamária é formado por tecido conjuntivo, gordura, vasos e nervos. A proporção entre parênquima e estroma é regulada por hormônios. Durante a lactação há uma maior proporção de parênquima em relação ao estroma, e no período seco esta proporção se inverte (Cunningham & Klein, 2008).

Nas células epiteliais secretoras, os constituintes do leite são sintetizados no retículo endoplasmático liso (lipídeos) e rugoso (proteínas), e nos ribossomos (proteínas), movendo-se em seguida para o complexo Golgiense. Após a secreção, os constituintes do leite são acumulados no lúmen alveolar, que serve como compartimento extracelular e que também constitui um local de controle da síntese e secreção do leite (Rennison et al., 1993).

Durante a gestação, ocorre o processo de lactogênese que corresponde à diferenciação e multiplicação das células epiteliais

mamárias. Vários hormônios estão envolvidos no processo de lactogênese e galactopoiese (manutenção do ciclo de lactação). Este último necessita de estímulos neurais e endócrinos para manter o número de células alveolares, síntese celular, bem como a eficácia do reflexo de ejeção do leite (Tucker, 2000).

A prolactina, que é o principal hormônio responsável pela lactação, é secretada pela hipófise anterior e responsável pela manutenção da lactação. A ocitocina, hormônio secretado pela hipófise posterior, está envolvida no processo de liberação do leite e também na estimulação das contrações uterinas durante a fase folicular do ciclo estral e durante os últimos estágios da gestação. Este hormônio é também produzido pelo corpo lúteo induzindo o endométrio a liberar prostaglandina (PGF $2\alpha$ ), responsável pela regressão do corpo lúteo e por provocar contrações uterinas ajudando no transporte espermático no trato reprodutivo feminino e no parto (Collier et al., 1984).

Animais como bovinos e caprinos possuem locais para o armazenamento de leite, os quais são denominados de cisternas. Esta especialização permite ao animal ser capaz de sintetizar uma grande quantidade de leite. Todavia, a maior parte do leite retirado durante a ordenha está armazenada no sistema de ductos. Dos ductos principais, o leite é secretado para a cisterna da glândula, em seguida para a cisterna do teto. A comunicação entre estes dois compartimentos se dá através de uma crista circular (ânulo) que contém uma veia e algumas fibras de musculatura lisa. Por fim, a cisterna do teto comunica-se com o exterior da glândula por uma abertura estreita no final do teto, denominada ducto papilar (canal do teto) que se abre no óstio papilar que dispõe de fibras musculares lisas. O esfíncter aparece no final do teto e é a estrutura responsável pela retenção do leite (Dyce et al., 2010).

Os tecidos que circundam o canal do teto são a primeira linha de defesa contra microrganismos, uma vez que este é o caminho principal pelo qual os patógenos penetram no interior da glândula mamária. O músculo do esfíncter do teto, por exemplo, mantém o canal do teto fechado entre ordenhas, impedindo a invasão da glândula mamária por microrganismos patogênicos. No período entre lactações se forma um tampão de queratina na extremidade do teto que constitui outra importante barreira física contra patógenos. Tais barreiras fazem com que o epitélio mamário, diferente de outros epitélios como o intestinal, bucal ou respiratório, raramente seja estimulado por componentes bacterianos. Isso significa que as bactérias que penetram neste órgão geralmente são reconhecidas como invasores,

desencadeando uma resposta imune do organismo (Rainard & Riollet, 2005). Portanto, quantidades tão pequenas quanto 15 a 40 UFC de *E. coli* ou 40 a 60 UFC de *S. aureus* (Erskine et al., 1989; 1990) são suficientes para desencadear reação inflamatória intramamária.

### 3.2 Mastite

A mastite é a inflamação da glândula mamária causada, na maioria dos casos, por bactérias (Watts, 1988). Entretanto, trata-se de uma enfermidade plurietiológica e multifatorial, causada também por vírus, fungos (Spanamberg et al., 2009), algas (Filippsen et al., 1999) ou até mesmo por traumas ocasionados por agentes físicos no canal do teto, ocorridos pela repetitiva manipulação durante o processo de ordenha, por exemplo, ou metabólicos, como o aumento na quantidade de leite residual no úbere. Os microorganismos que usualmente estão do lado de fora da glândula, na presença de uma lesão ou mesmo pelo esfíncter que fica temporariamente aberto após a ordenha, penetram no canal do teto e, com a exposição repetitiva, tem-se o estabelecimento da infecção (Cunningham & Klein, 2008).

A identificação dos agentes etiológicos envolvidos é fundamental para o sucesso do tratamento e para o estabelecimento de estratégias eficazes de controle e profilaxia da doença. Dentre os mais de 137 microorganismos descritos como patógenos, os mais frequentes são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Watts, 1988; Harmon, 1994). As bactérias do gênero *Staphylococcus sp.*, que lideram o ranking dos agentes etiológicos causadores de mastite, são capazes de causar infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura, com grande perda da produção de leite, especialmente quando causadas por *S. aureus* (Sabour et al., 2004).

O grau de inflamação da glândula mamária é dependente do nível sanitário e de produção do animal, os quais são influenciados por outros fatores, tais como a supervisão do serviço de ordenha, de características inerentes ao ordenhador, nível nutricional do animal, sistema de alimentação, número de ordenhas e número de lactações da vaca (Lam et al., 2013).

Conforme a sua manifestação, a mastite pode ser classificada em subclínica ou clínica (Philpot & Nickerson, 1991). Nos casos de mastite clínica, os sinais são macroscópicos, causados por uma infecção mais severa, o que acarreta na mudança no aspecto do leite e na sua

composição, além de alterações no tecido mamário (febre, vermelhidão, tremores musculares, prostração, entre outros) (Philpot & Nickerson, 1991). Animais com mastite clínica são facilmente identificados durante a ordenha através do teste da caneca de fundo preto. Por ser uma infecção grave, além de um efeito negativo sobre o bem-estar do animal, em alguns casos, pode levar ao descarte precoce do mesmo. Todavia, é a mastite subclínica que tem maior impacto negativo ao setor leiteiro, uma vez que se alastra silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou do leite (Medeiros, 2009). Para a identificação de animais com mastite subclínica recomenda-se o uso frequente da metodologia *California Mastitis Test* (CMT), que consiste na formação de um gel de espessura variada após a mistura do leite com um reagente CMT (detergente aniônico), que destrói os glóbulos brancos (leucócitos) existentes no leite e coagula o DNA liberado pelos mesmos (Rosenberger, 1993). A falsa segurança, gerada pela inexistência de sinais externos, contribui para o alastramento rápido da doença no rebanho, uma vez que a relação entre ocorrência de mastite subclínica é muito maior quando comparada a de mastite clínica (Medeiros & Souza, 2009; Mdegela et al., 2009). A mastite subclínica também tem consequências sobre a qualidade do leite, alterando, por exemplo, a relação oxidante/antioxidante do tecido mamário, acarretando na diminuição dos níveis de antioxidantes no leite (Atakisi et al., 2010). Além disso, uma das consequências da mastite é a formação de um tecido conjuntivo dentro do úbere como resultado da tentativa da glândula para driblar a infecção. A presença deste tecido conjuntivo limita a área onde os ductos e alvéolos podem se desenvolver e reduz o potencial de produção da glândula (Cunningham & Klein, 2008). A elevada incidência de mastite nos rebanhos bovinos é responsável por uma perda de 33 a 45% na produção de leite durante a lactação do animal, representando uma diminuição de cerca de 900 kg de leite por animal por lactação (Hand et al., 2012).

Para o tratamento da mastite, o uso de antibióticos, apesar de ser considerado o único método comprovado (Mukherjee et al., 2005), não é totalmente eficaz. Isto porque as bactérias se alojam em locais aonde a ação dos antibióticos é dificultada (Zafalon et al., 2007) e também devido a crescente resistência bacteriana aos antibióticos. Cabe destacar que, além do tratamento clínico da doença, é indispensável a implantação de um programa de controle desta enfermidade para possibilitar o isolamento e a identificação precoce de seu agente etiológico (Bueno et al., 2003). Uma estratégia possível para o controle

da mastite envolve a manipulação do mecanismo de defesa do hospedeiro, por exemplo. Tem-se demonstrado que o fornecimento de micronutrientes que atuam como antioxidantes, como a vitamina E e selênio, melhoram a resposta imune do animal (Spears & Weiss, 2008).

Além do uso massivo de antibióticos para tratamento de mastites, a administração universal de terapia da vaca seca (TVS) faz parte dos programas para reduzir a incidência de mastite contagiosa desde os anos 60 (Bradley, 2002). Se, por um lado, a TVS é um método importante para prevenir novas e/ou recorrentes infecções, por outro lado, tornou os produtores de leite muito dependentes deste recurso e, em se tratando de produtores orgânicos, poucas alternativas são utilizadas como substitutos à TVS. Lembrando que, as mastites subclínicas causadas por *S. aureus* geralmente são tratadas no período não lactante, devido à baixa taxa de cura em tratamentos feitos durante a lactação. Ainda assim, a TVS ajuda a curar 50% da mastite causada por *S. aureus* (Wattiaux, 2013).

A ampla administração de antibióticos resulta, ainda, na seleção de patógenos resistentes e a presença de resíduos de antibióticos no leite (Nickerson et al., 2009). *S. aureus* é apontado como um agente de alta resistência às adversidades no ambiente e resistente aos antibióticos (Diaz et al., 2010), sendo este fator limitante ao tratamento. A presença desses resíduos no leite tem sido relatada por diversos autores como um grande problema de saúde pública, podendo causar desde uma leve reação alérgica até casos mais graves como choque anafilático, além de acarretar sérios prejuízos para as indústrias de laticínios (Barros et al., 2001; Borges et al., 2000; Folly & Machado, 2001; Nascimento et al., 2001; Nero et al., 2007; Fonseca et al., 2009; Martins et al., 2011; Maluf Da Silva et al., 2012; Vieira et al., 2012). Considerando todos esses aspectos tem-se buscado alternativas ao uso de antibióticos visando à redução no seu uso, diminuição no aparecimento de cepas resistentes e também como alternativa à produção orgânica (Diarra et al., 2013; Wei et al., 2014).

### ***3.3 Estudos in vitro utilizando células da glândula mamária bovina***

Diversos trabalhos utilizando animais para o estudo do controle da mastite estão descritos na literatura. Nesses casos, a mastite é induzida em animais como ratos ou vacas, inoculando-se os agentes patogênicos ou seus componentes (Kornalijnslijper et al., 2004; Lauzon



et al., 2006; Chen et al., 2013; Wei et al., 2014). Após indução da infecção, os animais são abatidos para a realização de análises tais como contagem bacteriana, avaliação histopatológica, dosagem de citocinas entre outros marcadores bioquímicos (Lauzon et al., 2006; Chen et al., 2013; Diarra et al., 2013; Wei et al., 2014). No entanto, o desenvolvimento de modelos alternativos que substituam ou reduzam o uso de animais em pesquisas e ensino é uma demanda da sociedade (Basso et al., 2013) prevista na legislação brasileira. Através da lei 11.794 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que regulamenta o artigo 225 da Constituição Federal foram estabelecidas normas para o uso de animais no ensino e em pesquisas científicas. De acordo com a Constituição, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), vinculado ao Ministério da Ciência e Tecnologia, é o órgão responsável pela fiscalização a nível nacional do cumprimento destas leis. Dentre suas atribuições está o ato de zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade científica e também o monitoramento e avaliação da introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa.

Desse modo, o uso de modelos experimentais *in vitro* para o estudo da resposta inflamatória e triagens iniciais de produtos farmacológicos tem sido considerado uma alternativa ao uso de animais vivos em pesquisas (Wallum et al., 2005; Basso et al., 2013; Wei et al., 2014). Embora os métodos *in vitro* não substituam totalmente a necessidade de animais em experimentos, reduz em parte esta demanda. Deste modo, alguns modelos *in vitro* têm sido propostos utilizando células epiteliais mamárias (CEM) bovinas, onde uma população homogênea de células é exposta a mesma pressão de análise na ausência de interferências ambientais (Rabot et al., 2006; Wei et al., 2014).

A cultura de CEM bovinas tem sido apontada como um modelo *in vitro* adequado para o estudo de diferentes funções da glândula mamária, dentre elas, a resposta inicial à infecção (Rabot et al., 2006; Wei et al., 2014). Hoje se sabe que diversos tipos celulares podem produzir citocinas e óxido nítrico (NO), incluindo as próprias células epiteliais da glândula mamária, além dos macrófagos e leucócitos residentes que migram para a glândula em resposta a infecção (Strandberg et al., 2006). Desse modo, quando se busca um tratamento alternativo para a mastite deve-se ter como alvo não apenas compostos com ação antimicrobiana, mas também anti-inflamatórios. Este tipo de

terapia deverá auxiliar a aliviar os sinais causados pelos danos ao tecido provocado pelo processo inflamatório.

As células MAC-T (Mammary Alveolar Cell-T) (Huynh et al., 1991) constituem uma linhagem epitelial mamária já estabelecida que vêm sendo utilizada na investigação das funções da glândula mamária e também na expressão de mediadores de processos inflamatórios (Rennison et al., 1993; Boudejallab et al., 1998; Boulanger et al., 2002; Rose et al., 2002; Alluwaimi et al., 2003; Piotrowska-Tomala et al., 2012). Contudo, esta linhagem não está disponível comercialmente, existindo a dificuldade em adquiri-la ou isola-la a partir de uma cultura primária. Há também o risco inerente de extrapolação dos resultados obtidos com cultura isolada para a complexidade de organismos vivos. Deste modo, alguns trabalhos, tem relatado o uso de explantes mamários (fatias de tecido alveolar) no estudo de diferentes aspectos funcionais da glândula mamária bovina, em especial aqueles relacionados à síntese de leite e seus constituintes (Byatt & Bremel, 1986; Shamay et al., 1987; Baumrucker & Stemberger, 1989; Shamay et al., 1997; Feuermann et al., 2004). Mais recentemente, tem-se investigado o uso de explantes mamários bovinos no estudo da resposta inflamatória e imunitária da glândula mamária (Rabot et al., 2006). Os resultados encontrados a partir dos explantes mamários são similares aos encontrados *in vivo*, sugerindo ser este modelo adequado para o estudo da resposta inflamatória da glândula mamária (Rabot et al., 2006).

No presente trabalho, um modelo *in vitro*, utilizando explantes de glândula mamária bovina, foi adaptado com a intenção de avaliar a toxicidade de extratos de própolis sobre células saudáveis. Este modelo poderá ser aplicado como um screening de produtos com potencial de uso no controle da mastite bovina anteriormente aos ensaios *in vivo*.

### **3.4 Própolis**

Diante da necessidade de controle da mastite nos rebanhos e as implicações no uso de antibióticos citadas anteriormente é de interesse o desenvolvimento de medidas alternativas para o controle e tratamento da doença, destacando-se o potencial dos produtos fitoterápicos. Os produtos naturais constituem uma fonte importante de terapia alternativa, os quais têm sido explorados há séculos por várias comunidades, por suas atividades contra um largo espectro de doenças que acometem o ser humano e os animais (Phillipson et al., 1997). No entanto, embora reconhecidos como uma alternativa à medicina

convencional, os produtos naturais têm sido ignorados pela falta de evidências científicas e clínicas da sua eficácia.

Neste contexto, a própolis destaca-se dentre os produtos naturais com potencial de uso no tratamento da mastite devido as suas reconhecidas atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana (Lougercio et al., 2006). Há milhares de anos, a própolis tem sido usada pelo homem para os mais diversos fins. Existem indícios de que desde a idade antiga os sacerdotes faziam uso da própolis no processo de mumificação de cadáveres (Salatino, 2005) e nos tempos mais modernos este produto tem despertado o interesse da indústria farmacêutica e cosmética. Este interesse está relacionado à atividade biológica associada principalmente a presença de compostos como flavonoides, terpenos, ácidos e ésteres (Santana et al., 2012). Estes são também denominados de metabólitos secundários, uma vez que não tem distribuição universal, e não são necessários à sobrevivência da planta. Por outro lado, desempenham papel importante na interação da planta com o ambiente e estão envolvidos na adaptação das espécies a um dado ecossistema (Harbone, 1999).

Própolis é um termo genérico utilizado para denominar o material resinoso e balsâmico coletado e processado pelas abelhas a partir de diversas fontes vegetais usado para vedação de suas colmeias (Bankova, 2005). A própolis é constituída por resinas vegetais, seguido de ceras de abelhas, óleos essenciais, açúcares e pólen. O produto tem sido apontado como o responsável pela baixa incidência de bactérias dentro das colmeias (Kalogeropoulos et al., 2009) e esta atividade biológica associada principalmente a presença de compostos como flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos e ésteres (Abd El Hady & Hegazi, 2000; Cushnie & Lamb, 2005; Popova et al., 2009; Santana et al., 2012).

Sua composição pode ser afetada por diversas características tais como a flora da região, estações do ano, fatores genéticos ligados às abelhas e a natureza dos tecidos vegetais disponíveis, como flores, ramos, brotos, exsudados e outras partes. Em função desta variabilidade, a própolis pode assumir uma coloração que varia do amarelo claro ao negro (Sousa et al., 2007).

Segundo Park et al. (2002), os diversos estudos já realizados com própolis de diferentes regiões brasileiras demonstram uma predominância de resinas de cor marrom e verde. Entretanto, em alguns locais como no nordeste e norte brasileiros podem-se encontrar amostras de coloração vermelha, típica de países caribenhos e de algumas

localidades da Venezuela. A própolis verde brasileira, denominada Green propolis, é internacionalmente reconhecida por suas características organolépticas e por ser rica em derivados do ácido  $p$ -cumárico (Bankova & Marcucci, 1999; Sousa et al., 2007).

Estudos de tipificação da própolis servem à diferenciação das amostras provenientes de regiões geográficas distintas segundo um perfil químico típico, empregando marcadores principalmente entre os grupos de flavonoides e ácidos fenólicos (Park et al., 2002; Aguiar et al., 2013). Neste sentido, Park et al. (2000) classificaram a própolis brasileira em 12 grupos em função de sua composição físico-química. Os autores concluíram que cinco destes grupos pertenciam à região sul, um grupo à região sudeste e seis grupos à região nordeste. A análise por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa revelou certa semelhança entre os perfis químicos das amostras do sul e sudeste, principalmente na composição de flavonoides. Neste caso, o ácido  $p$ -cumárico, a pinobanquisina e o caempferol estiveram presentes em todas as amostras. Nas amostras de própolis do Nordeste não foram encontrados flavonoides. Compostos como apigenina, crisina, galangina e lectocrisina apareceram apenas nas amostras de própolis do sul do Brasil, enquanto nas do sudeste, foram exclusivos os compostos isosacuranetina e caempferida. O ácido ferúlico, por sua vez, foi o único composto aromático encontrado em todos os grupos analisados. Outros compostos aromáticos como o ácido benzóico e o metil-hidrocinamato foram encontrados nas amostras do sul e nordeste, e os ácidos  $p$ -cumárico, hidrocinâmico e 4-metóxi-benzóico foram frequentes apenas nas amostras dos grupos do sudeste. Dentre os terpenos, foram isolados  $\beta$ -cariofileno na própolis nordestina, farnesol nas do sudeste e eudesmol nas do sul.

Estudos de tipificação da própolis no estado de Santa Catarina são raros, apesar da importância da apicultura na região (Silva, 2004). Nesse contexto, o Núcleo de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), realizou um estudo pioneiro com este objetivo. Os resultados demonstraram clara dispersão das amostras de acordo com a origem geográfica como era o esperado, mas também em função da época de produção, corroborando com a importância da sazonalidade na classificação da própolis (Zeggio et al., 2012a). Além disso, apesar da própolis de zonas temperadas tenderem a ter uma maior concentração de flavonoides comparada à própolis de climas tropicais foi verificado que a própolis do município de São Joaquim, localizado na serra catarinense, possui um conteúdo significativo de flavonoides

nas amostras coletadas em regiões de altitude e que este teor é influenciado pela estação (Zeggio et al., 2012a,b; Meneghelli et al., 2013). Extratos coletados em regiões distintas do estado catarinense, no município de Água Doce (região oeste catarinense, divisa com estado do Paraná) e Urupema (região serrana de Santa Catarina, próximo a São Joaquim) apresentaram perfis químicos típicos e semelhantes, com alterações apenas nas quantidades dos compostos em função da estação do ano (Zeggio, 2013- comunicação pessoal), deste modo, despertando o interesse no estudo das propriedades fitoterápicas destes extratos.

Considerando o efeito da sazonalidade sobre a composição química da própolis, a legislação brasileira, através da IN 3 de 19 de janeiro de 2001 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do MAPA estabeleceu um padrão oficial que contempla a própolis in natura e o extrato de própolis (BRASIL, 2001). Outras características como aspectos sensoriais, bem como acondicionamento são regulamentados por essa IN para que possam ser comercializado no País.

O efeito do período do ano em que a própolis é coletada também tem mostrado influência sobre a as suas propriedade biológicas (Park et. al., 2000; Meneghelli et. al., 2013). Lu et al. (2005) notaram que os extratos etanólicos de própolis fabricados com a resina coletada no mês de agosto, em regiões diferentes de Taiwan, tiveram maior atividade antibacteriana contra *S. aureus*, comparada aos extratos de própolis coletados nos meses de outubro e novembro. Os mesmos autores também observaram que a idade da cultura bacteriana, o pH do meio e as condições de temperatura durante a incubação afetaram a suscetibilidade das colônias aos extratos.

O mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana da própolis é complexo e não pode ser atribuído a apenas uma classe de metabólitos, sendo decorrente do sinergismo entre flavonoides e sesquiterpenos, segundo alguns autores (Kedzia, et al., 1990, Popova et al., 2009). Kujumgiev et al. (1999), por exemplo, ao estudarem a própolis tropical, constataram que esta não continha os compostos conhecidos como responsáveis pela atividade antimicrobiana, contudo, ainda assim, os extratos mostraram essa atividade, indicando que diferentes combinações de substâncias na própolis são essenciais para garantir sua atividade biológica. Da mesma forma, Silva et al. (2006) ao investigarem a capacidade de extratos de própolis de inibir o crescimento de *S. aureus* e também à sua capacidade para sequestrar radicais DPPH (atividade antioxidante), verificaram que os teores de

flavonoides tinham maior influencia sobre a atividade antioxidante do que sobre a capacidade inibitória antimicrobiana. Outros autores relataram que o extrato etanólico de própolis oriundo de várias regiões brasileiras foi capaz de inibir também o crescimento de bactérias do gênero *Streptococcus* (Park et al., 2000).

Além disso, apesar de amplamente discutido, o mecanismo de ação ainda é desconhecido (Silva et al., 2006). Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) verificaram que a própolis inibe o crescimento bacteriano por prevenir a divisão celular, resultando em formas pseudo-multicelular. Ela também desorganiza o citoplasma, a membrana citoplasmática e a parede celular, causando bacterólise parcial e inibindo a síntese de proteínas. Portanto, segundo os autores, o mecanismo de ação da própolis não é similar aos descritos classicamente para antibióticos convencionais que interferem na síntese dos peptidoglicanos, os quais são responsáveis pela integridade da parede celular, ou inibem a atividade da DNA girase ou topoisomerase II enzimas essenciais à sobrevivência bacteriana (Goldeberg, 1965).

Além de atividade antimicrobiana alguns trabalhos tem também demonstrado o efeito citotóxico da própolis sobre determinados tipos celulares. Esta propriedade biológica tem sido investigada visando o uso da própolis como anticancerígenos, anti-angiogênicos e antitumorais em potencial (Banskota et al., 2001; Orsolich et al., 2009; Montoro et al., 2012; Meneghelli et al., 2013; Zizic et al., 2013; Calhelha et al, 2014). No entanto, a maior parte dos modelos *in vitro* utilizados para a análise da citotoxicidade de extratos de própolis usou células isoladas e modificadas.

Considerando o exposto, o presente trabalho avaliou *in vitro* a atividade antimicrobiana de extratos própolis de composição química distinta frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli*, e o efeito sobre a viabilidade de explantes de glândula mamária bovina sadia, objetivando relacionar o efeito das concentrações antimicrobianas com possíveis danos ao úbere bovino antes de sua administração *in vivo*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Extração da Própolis

Amostras de própolis de três municípios catarinenses (Urupema, São Joaquim e Água doce) (Figura 1) e do estado de Minas Gerais, coletadas durante o inverno de 2011 (Figura 2), foram utilizadas nos ensaios biológicos. As amostras dos municípios de Urupema e Água Doce foram identificadas previamente como típicas do estado catarinense, mostrando pouca flutuação sazonal. Já a amostra de São Joaquim mostrou composição química similar a de Minas Gerais, por conter artepelina C (Maraschin, 2013 - comunicação pessoal).

O município de Água Doce, localizado no oeste do estado catarinense (Figura 1), cerca de 970 metros acima do nível do mar, se caracteriza por apresenta clima mesotérmico úmido, sem estação seca, com verões frescos e invernos rigorosos com ocorrência de geadas e neve. A vegetação é densa, formada por árvores de grande porte como: pinheiro, imbuíã, cedro, anjico, louro, canela, branquilha, bracinga e outras plantas menores como guamirim, erveira, guaviroveira e pitangueiras. Já os municípios de Urupema e São Joaquim são vizinhos territoriais, localizados na serra catarinense, a aproximadamente 1500 metros acima do nível do mar. O clima da região é classificado como temperado úmido apresentando verões frescos e invernos muito rigorosos, considerados os municípios mais frios do Brasil com temperatura média anual em torno de 13 °C. Quanto à flora, a região se caracteriza por ser uma zona de transição de matas entrecortadas com predomínio de angiospermas, principalmente dos gêneros *Pinus* sp. e *Araucária* sp. e campos nativos, caracterizados pela presença de plantas gramíneas dos gêneros *Avena* sp., *Hemarthria* sp., *Axonopus* sp *Trichocline* sp., entre outros. Essas duas classes, com outros subtipos, conforme a altitude e o relevo formam muitas vezes mosaicos, zonas de transição, ao contrario dos demais campos sulinos (IBGE, 2008).

As amostras de própolis bruta catarinense foram coletadas por apicultores associados da Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina (FAASC), em suas propriedades, e encaminhadas ao Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica Vegetal (LMBV-CCA-UFSC) através de uma parceria firmada entre FAASC, Epagri/SC e a Universidade Federal de Santa Catarina. Após uma análise fitoquímica dos materiais realizada pelo LMBV, as amostras de interesse foram então cedidas para a realização do presente estudo.

Para a preparação dos extratos, em laboratório, as amostras de própolis foram processadas (remoção de eventuais sujidades e trituração), acondicionadas em embalagens plásticas herméticas e armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, amostras (3 g – peso seco) de própolis foram maceradas com 30 mL de solução de etanol 70% (v/v), em seguida, acondicionadas em frascos âmbar e mantidas ao abrigo da luz por 24 h. O macerado foi filtrado a vácuo e o extrato congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 h. O extrato hidroalcoólico (EH), então, foi centrifugado (10.000 rpm, 10 min), coletando-se o sobrenadante que, por sua vez, foi seco em estufa de ventilação forçada mantida a  $60^{\circ}\text{C}$ . Os resíduos obtidos foram dissolvidos nas concentrações desejadas para as análises fitoquímicas e biológicas.



Figura 1. Localização geográfica dos municípios catarinenses onde foram coletadas as amostras de propolis.



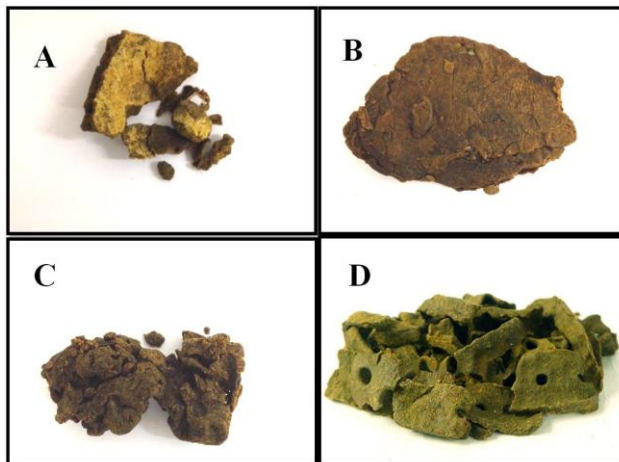


Figura 2. Própolis bruta produzida em (A) São Joaquim, (B) Água Doce, (C) Urupema e (D) Minas Gerais.

## 4.2 Caracterização Fitoquímica

### 4.2.1 Fenólicos Totais

Os conteúdos de fenólicos totais nos extratos hidroalcoólicos de própolis foram determinados através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico (20 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $y = 0,0107x$ ;  $r^2 = 0,9773$ ). Para isso, foram adicionados à 45  $\mu\text{L}$  de amostra, 150  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10, v/v) e 120  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%, p/v). Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, as absorvâncias foram lidas a 765 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de extrato (EAG/mg).

### 4.2.2 Flavonoides

Os teores de flavonoides foram determinados através da reação colorimétrica com cloreto de alumínio, conforme metodologia descrita por Popova et al. (2004). Este método baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonoides, acarretando em uma intensificação de suas absorções e em um deslocamento para maiores comprimentos de onda (Wollenweber,

1988). Para realizar a reação foram adicionados à 43 µL de amostra, 43 µL de AlCl<sub>3</sub> (2%, p/v) e 215 µL de EtOH. Após um período de incubação de 30 minutos ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras a 425 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como µg de equivalentes de quercetina ( $y = 0,0129x$ ;  $r^2 = 0,9881$ ) por mg de extrato (EQ/mg).

#### 4.2.3 *Atividade Antioxidante*

O potencial antioxidante dos extratos de própolis foi avaliado através do teste do DPPH, o qual é baseado na capacidade do radical livre estável, 2,2-difenil-2-picrilidrazil, reagir com compostos doadores de H<sup>+</sup> (Choi et al., 2002). A reação foi realizada, adicionando-se à 10 µL de amostra, 290 µL da solução diluída de DPPH, ajustada através do teste de reatividade para uma absorvância entre 0.50 a 0.60 à 545 nm. Após 30 minutos de incubação à 23°C, ao abrigo da luz, foi realizada a leitura em leitor de microplacas à 545 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH/mg de própolis. Os ensaios fitoquímicos foram realizados em triplicatas.

### 4.3 *Ensaio Antimicrobiano*

#### 4.3.1 *Cepas*

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no laboratório de bacteriologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (Fepagro/RS). Os extratos de própolis foram testados frente às cepas padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e de *E. coli* ATCC 8739, além de 2 isolados de campo de cada cepa. Os isolados de campo foram obtidos da bacterioteca do Instituto, provenientes de amostras de leite para identificação de agente etiológico. Foi feita, previamente, a confirmação da pureza das colônias através da semeadura em meios seletivos (agar Baird-Parker com telurito para *S. aureus* e agar MacConkey para *E. coli*).

#### 4.3.2 *Padronização do Inóculo*

Isolados bacterianos liofilizados foram resuspenso em glicerol e semeados por esgotamento em placas de Petri com meio Agar BHI (Brain Heart Infusion). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

A densidade populacional inicial dos inóculos foi padronizada utilizando-se um controle de turbidez equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5, equivalente a uma suspensão contendo de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL (British Standard Institution, 2006). Nos testes foi utilizada a diluição logarítmica de  $10^5$  UFC/mL do inóculo em caldo Muller Hinton.

#### 4.3.3 Método de plaqueamento em profundidade (Pour Plate)

O protocolo utilizado foi adaptado de Sperotto (2012). Inicialmente, foram preparadas diluições seriadas de própolis nas concentrações de 1.000, 750, 500, 250, 200, 150 e 100  $\mu\text{g/mL}$  em EtOH:H<sub>2</sub>O (8:92, v/v) para os extratos de São Joaquim, Urupema e Minas Gerais e Água Doce. Após a obtenção dos resultados preliminares, verificou-se a necessidade de testar também as concentrações de 450, 400 e 350 e 300  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato de Água Doce, a fim de se determinar a partir de qual concentração este extrato se iniciava a redução do crescimento bacteriano. Em tubos eppendorfs, foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  das diluições de própolis e 100  $\mu\text{L}$  do inóculo padronizado equivalente a  $10^6$  UFC/mL, totalizando uma diluição logarítmica de  $10^5$  UFC/mL (Figura 3). Placas contendo somente o inóculo foram utilizadas como grupo controle. Após um período de incubação de 6 e 24 horas (tempo de contato), os conteúdos dos tubos foram depositados em placas de Petri, e em seguida adicionados 20 mL de meio de cultura Agar Mueller Hinton (Figura 3).

Para a cepa padrão e os isolados de *S. aureus* a contagem de colônias foi feita 48 h (Figura 3) após a adição do meio de cultura e para *E. coli* após 24 h (Figura 3), devido ao comportamento de crescimento distinto das duas espécies. A notação dos dados foi feita obtendo-se o número de colônias viáveis ( $\text{Log}_{10}$  UFC/mL), nas placas que era possível a contagem. As placas onde o crescimento foi incontável, porém, visualmente observava-se redução de crescimento em comparação ao grupo controle, foi estimada a contagem de  $10^4$  já que o controle estaria com, pelo menos,  $10^5$  (inóculo inicial). Para cada concentração de cada extrato, foram feitas duplicatas em dois experimentos independentes.

Em ensaio preliminar foram feitos testes de placas com meios de cultura com e sem neutralizador. O uso de neutralizador é utilizado em muitos trabalhos para bloquear o efeito da substância testada, o que indicaria se a mesma causa inativação bacteriana (com neutralizador) ou

inibição bacteriana (sem neutralizador). Como neutralizador, adicionou-se ao agar Muller Hinton, 3% de Polissorbato (Tween 80) mais 0.3% lecitina de soja. Porém, como não se evidenciou efeito neutralizador, ou seja, o crescimento bacteriano ocorreu de forma igual nos dois tratamentos, os testes finais foram realizados sem neutralizador.

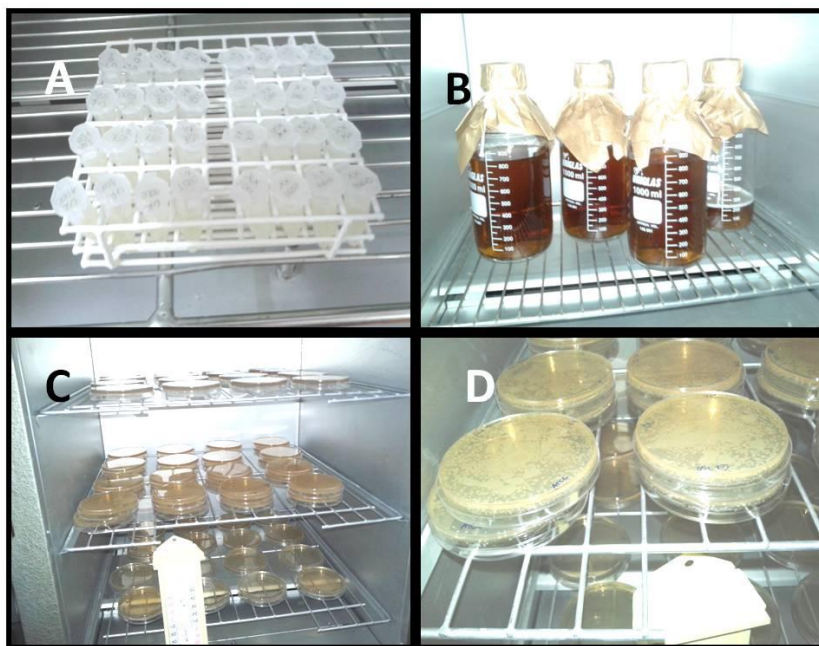


Figura 3. Ensaio antimicrobianos: (A) Diferentes concentrações de própolis incubadas com cepas de *S. aureus* e *E. coli*; (B) Meio de cultivo para bactérias Agar Mueller Hinton; (C) Placas de Petri com *S. aureus* em crescimento; (D) Placas de Petri com *E. coli* em crescimento.

#### ***4.4 Ensaio de viabilidade celular***

##### ***4.4.1 Coleta e manipulação do material***

Para obtenção dos explantes da glândula mamária bovina utilizou-se a metodologia descrita por Rabot et al. (2006), com modificações. Para isso, parte de um quarto de glândula mamária foi obtido de 18 vacas, logo após o abate (máximo 20 min.), em um

frigorífico comercial localizado no município de Águas Mornas (SC). Em condições assépticas, este foi fragmentado (7 cm x 3 cm) com o auxílio de pinças e bisturis, lavado com tampão fosfato salino (PBS), suplementado com penicilina G (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (2.5 µg/mL). Em seguida, os fragmentos foram acondicionados em tubos com meio de cultivo basal DMEM/F12, suplementado com insulina (10 µg/mL), hidrocortisona (0.5 µg/mL), penicilina G (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (2.5 µg/mL) e transportados ao laboratório. Sob capuz estéril, os fragmentos de úbere foram novamente manipulados e com auxílio de instrumento de biópsia PUNCH<sup>®</sup> explantes com cerca de 5mm x 2,5mm foram obtidos (Figura 4).

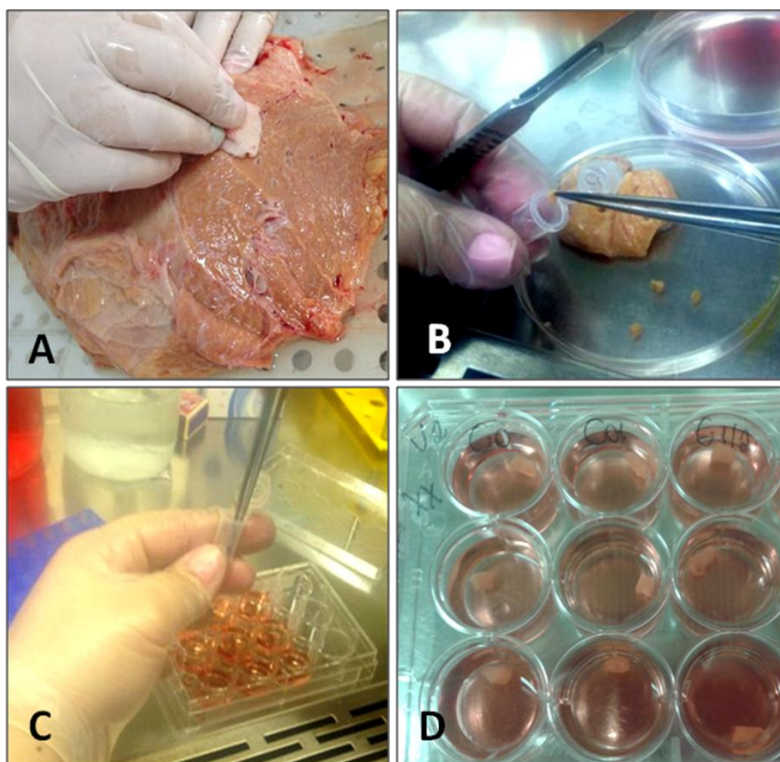


Figura 4. Coleta e preparação dos explantes da glândula mamária bovina: (A) assepsia da região alveolar a ser fragmentada, de um quarto de glândula mamária bovina cedido pelo frigorífico; (B) obtenção dos explantes em câmara de fluxo laminar; (C) Após a pesagem dos explantes, foi realizado o seu

acondicionamento em placas de cultivo com 12 poços; (D) Explante acondicionado em placas de 12 poços com diferentes concentrações de extratos de própolis.

#### *4.4.2 Efeito dos extratos de própolis sobre a viabilidade dos explantes da glândula mamária bovina*

O explantes produzidos através do uso do instrumento PUNCH<sup>®</sup> foram pesados e transferidos para placas de 12 poços, contendo 3,92 mL de meio de cultura de mesma composição que o utilizado no transporte e 0,08 mL das correspondentes concentrações de própolis dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de se obter concentrações finais correspondentes a 17,5, 35, 70, 140, 280 e 560 µg/mL. Os explantes foram mantidos a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 h, quando foi realizado o ensaio de viabilidade celular. Os grupos controles dos experimentos continham (a) 4 mL de meio e (b) 3,92 mL de meio acrescido de 0,08 mL de DMSO.

Após o período de incubação com o extrato, um novo meio de cultura foi adicionado, desta vez contendo MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil; 5 mg/mL) e incubado por 2 h e 30 min à 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO<sub>2</sub>. O princípio deste método reside no fato de que o MTT é capaz de entrar na célula e ser oxidado a MTT-formazan pelo superóxido produzido durante a atividade mitocondrial. Desta forma, a oxidação do MTT em seu produto corado MTT-formazan é proporcional à atividade mitocondrial e, por conseguinte, à viabilidade celular (Mosmann, 1983).

Decorrido o período de incubação, o meio foi retirado, sendo adicionado 3 mL de DMSO, para dissolução dos cristais de formazan produzidos durante a incubação com MTT. Diferentes períodos de tempo para completa dissolução dos cristais de formazan foram testados (10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min.), a fim de se determinar o menor tempo necessário. Após 180 min. de homogeneização verificou-se a completa solubilização dos cristais e a absorbância foi então quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. A fim de se comparar os valores de absorbância de explantes com diferentes pesos, a seguinte fórmula foi utilizada  $[(\text{Absorbância} \times 1000) / \text{peso do explante em mg}]$  (Peres et al., 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis, considerando como 100% de células viáveis os grupos-controle. Foram realizados dois experimentos independentes, totalizando seis repetições para cada extrato de própolis testado. A repetição foi representada pelo animal e para cada repetição foram feitas

três réplicas (explantes) (Figura 5) por concentração, por extrato, totalizando 576 explantes.

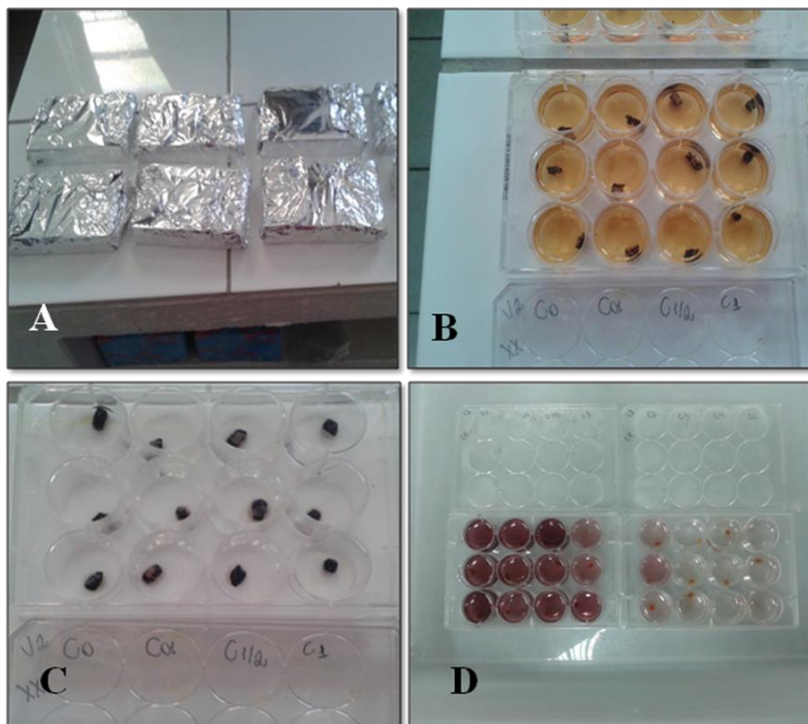


Figura 5. Avaliação da Citotoxicidade dos extratos de própolis. (A) incubação dos explantes com meio acrescido de MTT (5mg/mL) ao abrigo da luz; (B) explantes corados pelos cristais de formazan; (C) retirada do meio de cultivo e adição de DMSO; (D) resultado da solubilização dos cristais de formazan pelo DMSO.

#### 4.4.3 Estudo da viabilidade celular dos explantes da glândula mamária bovina

A viabilidade celular dos fragmentos de tecido mamário foi acompanhada ao longo do tempo, por um período de 96 h, realizando-se leituras diárias a partir do momento em que os explantes foram produzidos (considerado tempo 0). O meio de cultura foi trocado a cada 24 h e no momento da troca, ao grupo correspondente a leitura do dia (tempo 0, 24, 48, 72 e 96 h) foi adicionada solução de MTT (5 mg/mL).

Em seguida realizou-se os procedimentos de incubação e leitura idênticos aos realizados nos ensaios de viabilidade celular (item 4.4.2).

#### **4.5 Análise estatística**

Os perfis de fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante foram submetidos à análise de variância e expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). A diferença entre amostras pareadas foi determinada pelo LSMEANS. Para os ensaios antimicrobianos, como não se obteve homogeneidade de variância nem normalidade de resíduos utilizou-se a análise de variância não paramétrica pelo Teste de Kruskal-wallis e um pós-teste, de comparações múltiplas de Dunn. Os dados de viabilidade celular foram submetidos à análise de variância pelo Mixed Procedure (PROC MIXED), onde foram considerados no modelo o tipo de própolis, a concentração e a interação própolis\*concentração. Como houve efeito significativo de própolis\*concentração, utilizou-se essa interação na comparação das diferenças, através do LSMEANS, com ajustamento de Tukey. Foi também determinada a concentração inibitória ( $IC_{50}$ ), responsável por reduzir à metade a viabilidade celular, através de uma regressão estatística não linear. Os dados de viabilidade foram submetidos à análise de variância pelo GLM. Em todas as comparações a significância foi declarada  $P \leq 0,05$  e foram utilizados os pacotes estatísticos SAS (2004) e Graph Prism 5.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise Fitoquímica

Os extratos de própolis analisados não diferiram quanto aos teores de fenólicos totais ( $P < 0,05$ ; Tabela 1). Já em relação aos flavonoides, um maior conteúdo foi encontrado no extrato de própolis de Minas Gerais, seguido pelo de São Joaquim, Água Doce e Urupema ( $P < 0,05$ ). O extrato produzido em Urupema apresentou o menor potencial de inibição de radicais DDPH, i.e., menor atividade antioxidante. Entre os demais extratos não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo médio\* de fenólicos e flavonoides totais e determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis em estudo.

	<b>Fenólicos</b> ( $\mu\text{g de EGA/mg}$ )	<b>Flavonoides</b> ( $\mu\text{g de EQE/mg}$ )	<b>DPPH</b> (% de inibição do radical DPPH/mg)
<b>Água Doce</b>	116,29 $\pm$ 6a	10,25 $\pm$ 0,82c	85,39 $\pm$ 3,57a
<b>São Joaquim</b>	116,32 $\pm$ 21,5a	13,07 $\pm$ 0,11b	85,64 $\pm$ 0,51a
<b>Urupema</b>	113,58 $\pm$ 3,27a	7,33 $\pm$ 0,23d	72,76 $\pm$ 0,48b
<b>Minas Gerais</b>	97,97 $\pm$ 10,17a	15,91 $\pm$ 0,8a	81,89 $\pm$ 1,56a

\*Os valores representam a média de três extrações independentes  $\pm$  o desvio padrão da média. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os descritos na literatura no que diz respeito à caracterização fitoquímica deste produto natural. Silva et al. (2006), por exemplo, ao compararem extratos comerciais de própolis de diferentes municípios brasileiros das regiões sudeste e nordeste do Brasil, encontraram grande variação entre os conteúdos de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em função do local de produção. Estes autores encontraram uma atividade antioxidante inferior as do presente estudo, variando de 12,5 a 51% de inibição de radicais DPPH. Estas diferenças podem estar relacionadas à estação em que as amostras foram coletadas e, principalmente, ao método de extração uma vez que os autores

analisaram estes parâmetros em extratos comerciais, e sabe-se que, amostras com altos teores de flavonoides são destinadas ao mercado externo (Cabral, 2008). Castro et al. (2007) também encontraram conteúdos de fenólicos similares aos do presente estudo nos extratos hidroalcoólicos da própolis mineira, em torno de 90 mg/g, dependendo do mês de coleta. Para flavonoides, os valores foram superiores em comparação aos aqui apresentados, cerca de 30 mg/g. É possível sugerir que esta variação na concentração de flavonoides se deva a época de coleta da própolis, uma vez que, os autores realizaram as análises com extratos de própolis bruta, coletados durante a primavera e o verão, período em que existe mudança na flora local, o que pode ter contribuído para a elevação no teor daqueles compostos.

Na Argentina, Chaillou & Nazareno (2009) encontraram teores variando entre 92 à 187 mg/g para fenólicos totais e entre 6 à 18 mg/g para flavonoides em extratos de própolis de diferentes regiões daquele País. Apesar da alta concentração de fenólicos, a atividade antioxidante dos extratos foi entre 49 à 66% de inibição de radicais DPPH. Em amostras de própolis mexicanas, oriundas do deserto de Sonora, considerado o deserto biologicamente mais ativo da América do Norte, foram encontrados elevados teores de fenólicos (149 à 311 mg/g) e de flavonoides (58 à 131 mg/g). A atividade antioxidante nem sempre esteve associada a estes elevados valores, variando de 22 a 86%, sendo este último valor comparável ao potencial de inibição da vitamina C e do BHT, utilizados como controle (Velazquez et al., 2007).

Valores diferentes dos encontrados no presente estudo estão também descritos na literatura. Miguel et al. (2010), por exemplo, verificaram uma concentração de fenólicos menor em amostras de própolis produzidas em três regiões distintas ao sul de Portugal, em torno de 52,3 µg em equivalentes de pinocembrina por mg de própolis, menos da metade da concentração aqui encontrada. Entre os fatores que favorecem esta diferença estão às condições climáticas distintas entre as regiões em questão e também a diversidade de espécies pertencente à flora local. Nestas amostras, a concentração de flavonoides foi cerca de 10 µg em equivalentes de quercetina por mg de própolis, representando aproximadamente 24,5% do total de fenólicos, enquanto, em nosso estudo esta porcentagem foi cerca de 16% do total de fenólicos. Estes resultados já foram descritos por outros autores que tem demonstrado que a própolis produzida em climas temperados caracteriza-se pela maior concentração de flavonoides em detrimento de outros compostos, como ácidos fenólicos, mais comuns em própolis produzidas em clima

tropical (Bankova et al., 1995; Silva et al., 2006; Miguel et al., 2010). Ainda no mesmo estudo, os autores verificaram maior correlação entre o teor de fenólicos totais com o maior potencial de inibição de radicais DPPH, reafirmando a relação entre estas variáveis. Bonvehí & Gutiérrez (2011), encontraram em amostras de própolis do noroeste da Espanha elevados conteúdos de fenólicos totais e flavonoides, os quais variaram entre 200 à 340 mg/g e 72 à 161mg/g, respectivamente. Contudo, a atividade antioxidante média das amostras foi de apenas 30%. Resultados como estes, demonstram que os extratos de própolis são matrizes complexas e que, além de conterem fenólicos e flavonoides, podem ter outros compostos, os quais devem exercer forte influência sobre a atividade antioxidante e outras atividades biológicas, justificando a necessidade de se comparar extratos de diferentes origens em estudos de bioprospecção.

Apesar da análise realizada não ter tido como objetivo a identificação dos compostos fenólicos nos extratos, estudos prévios demonstraram que o flavonoide majoritário nas amostras da própolis de Minas Gerais é a artepélina C (Teixeira et al., 2005). As mais diversas atividades biológicas da própolis verde mineira têm sido atribuídas a este composto (Shimizu et al., 2004; Tani et al., 2010; Cheung et al., 2011; Bachiega et al., 2012). Poucos trabalhos tratam da composição química da própolis catarinense, porém, em estudo anterior Meneghelli et al. (2013) caracterizaram o extrato de própolis outonal do município de São Joaquim. Neste trabalho, os autores identificaram o flavonoide quercetina como majoritário na amostra. Entretanto, outros compostos, em menores concentrações, foram identificados como os ácidos gálico, protocatecuico, clorogênico, derivados do ácido isoclorogênico, ácido  $\rho$ -cumárico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico e o biflavonoide rutina.

Alguns pesquisadores afirmam que os flavonoides, além de estarem presentes em maiores concentrações em amostras de própolis europeias e chinesas, são, também, os compostos responsáveis pela atividade biológicas destes extratos (Hegazi, 2000; Bankova et al., 2000; Ahn et al., 2007). Diante desta afirmação é possível sugerir que a própolis de Minas Gerais e São Joaquim se assemelham a extratos coletados no hemisfério norte, por possuírem maior conteúdo de flavonoides quando comparados aos extratos de Urupema e Água Doce, que apesar de ainda não terem sido tipificados, tendem a se assemelhar a amostras de clima tropical.

É importante destacar que independente da composição química dos extratos de própolis, os registros científicos tem mostrado que estes possuem atividades biológicas diversas. Deste modo, amostras com teores menos expressivos de flavonoides, como no caso de Urupema e Água Doce, não são necessariamente, ineficazes biologicamente. Isto porque a atividade biológica de um extrato não pode ser atribuída a apenas uma classe de metabólitos, sendo decorrentes do sinergismo entre flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, sesquiterpenos, entre outros (Kedzia et al., 1990; Popova et al., 2009).

Considerando os valores encontrados nas amostras de própolis em estudo e comparando os resultados com os descritos na literatura, pode-se verificar que a própolis catarinense e mineira contem teores de fenólicos totais e flavonoides moderados a altos, e apresentam elevada atividade antioxidante, respaldando a investigação do seu uso em diversas terapêuticas como para mastite bovina.

## **5.2 Atividade Antimicrobiana**

Os extratos hidroalcoólicos de própolis reduziram o crescimento de *S. aureus* em todas as concentrações testadas, porém, sua eficácia foi dependente da origem e concentração (Figura 6; Tabela 2). Diferenças significativas no crescimento bacteriano na presença de própolis foram observadas em concentrações iguais ou superiores à 200 µg/mL para os extratos de Urupema, Minas Gerais e São Joaquim (com redução média de 1,5 log<sub>10</sub>) em relação ao inóculo inicial. Os extratos de própolis produzidos em Urupema e São Joaquim mostraram efeito bactericida semelhante à própolis verde de Minas Gerais, em concentrações a partir de 500 µg/mL. A própolis de Água Doce foi a que demonstrou mais fraca atividade antimicrobiana e somente a partir de 300 µg/mL este extrato gerou redução significativa do crescimento bacteriano em relação ao controle (Tabela 2). Apesar disso, apresentou o mesmo efeito bactericida dos demais extratos quando usado nas concentrações de 750 µg/mL e 1000 µg/mL, reduzindo a uma mediana zero (variação: 0 – 4000 UFC/mL).

Tabela 2. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL Log<sub>10</sub>) de *S. aureus* ATCC 25923 e 2 isolados de campo (média ± desvio padrão), a partir de inóculo inicial de 10<sup>5</sup> UFC/mL, frente a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis provenientes de três regiões de Santa Catarina e de própolis verde de Minas Gerais.

Concentração µg/mL	Minas Gerais UFC/mL Log <sub>10</sub>	São Joaquim UFC/mL Log <sub>10</sub>	Urupema UFC/mL Log <sub>10</sub>	Água Doce UFC/mL Log <sub>10</sub>
<b>0</b>	5,0±0,00 Ba	5,0±0,00 Ba	5,0±0,00 Ba	5,0±0,00 Ba
<b>100</b>	4,40±0,66 Ba	4,63±0,55 Ba	4,43±0,58 Ba	5,0±0,00 Ba
<b>150</b>	4,19±0,68 Ba	3,94±0,79 Ba	3,83±0,28 Ba	5,0±0,00 Ba
<b>200</b>	3,48±0,54 Aa	3,38±1,09 Aa	3,52±0,14 Aa	5,0±0,00 Bb
<b>250</b>	2,82±1,2 Aa	3,35± 1,3 A a,b	2,91±1,35 Aa	4,10±0,30 Bb
<b>300</b>	n.t.	n.t.	n.t.	3,81±0,44 A
<b>350</b>	n.t.	n.t.	n.t.	3,62±0,39 A
<b>400</b>	n.t.	n.t.	n.t.	4,49±0,72 A
<b>450</b>	n.t.	n.t.	n.t.	3,39±0,58 A
<b>500</b>	0,36±0,79 Aa	1,83±1,45 A a, b	0,31±0,55 Aa	2,94±1,14 Ab
<b>750</b>	0,31±0,79 Aa	0,41±0,87 Aa	0,31±0,80 Aa	1,57±1,16 Aa
<b>1000</b>	0,08±0,35 Aa	0,34±0,88 Aa	0,00±0,00 Aa	0,72±1,00 Aa

Os valores médios representam as contagens realizadas com 6 e 24 h de contato.\*Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam as diferenças significativas entre os extratos de própolis. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam as diferenças significativas entre as concentrações em um mesmo extrato (P<0.05).

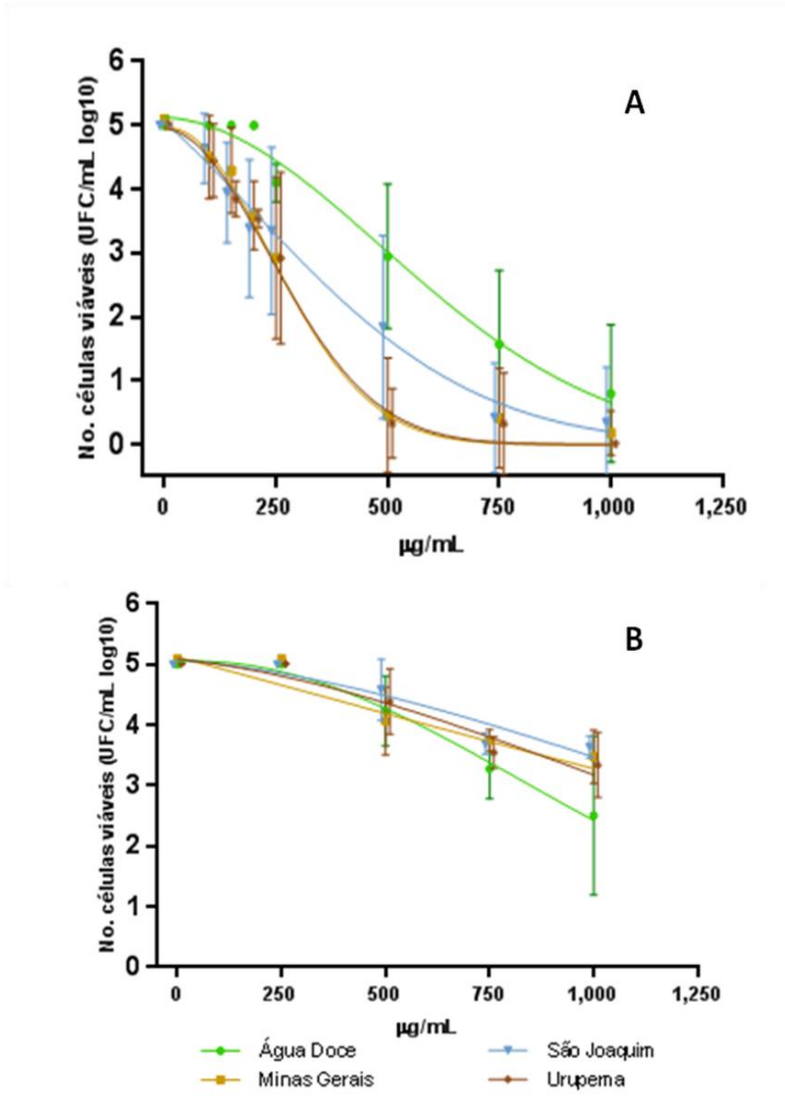


Figura 6. Redução logarítmica de crescimento de (A) *S. aureus* ATCC 25923 e 2 isolados de campo e (B) *E. coli* ATCC 8739 e 2 isolados de campo (média ± desvio padrão), a partir de inóculo inicial de  $10^5$  UFC/mL, frente a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis provenientes de 3 regiões de Santa Catarina e de própolis verde de Minas Gerais. Os valores médios representam a contagem realizada em 6 e 24 h de contato.

Entre as propriedades biológicas atribuídas a própolis, a mais estudada é a atividade antimicrobiana. O efeito antimicrobiano de extratos de própolis tem sido atribuído a diversas classes de compostos, principalmente a presença de flavonoides (Grange & Davey, 1990; Cushnie & Lamb, 2005; Vargas et al., 2004), ácidos fenólicos (Chaillou & Nazareno, 2010), ésteres (Velázquez et al., 2007) e terpenóides (Bankova et al., 1995; Silva et al., 2006).

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi interessante verificar que o extrato de própolis de Urupema, que contém o menor conteúdo de flavonoides e atividade antioxidante, mostrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* similar aos extratos com os maiores teores de flavonoides (Minas Gerais e São Joaquim). Diversos autores têm sugerido que os flavonoides exercem forte influência no crescimento de bactérias deste gênero (Mori et al., 1987; Sato et al., 2000; Alcaráz et al., 2000; Ferreira de Lima et al., 2006). Silva et al. (2006) concluíram que os teores de flavonoides de amostras de própolis apesar de terem maior correlação com a atividade antioxidante do que com a atividade bactericida contra *S. aureus*, também contribuíram para esta última atividade, o que possivelmente também ocorreu no presente estudo. Apesar das diferenças na composição de flavonoides nos extratos de São Joaquim e Minas Gerais demonstradas por outros autores (Teixeira et al., 2005; Meneghelli et al., 2013), é de se esperar que a presença destes deva ter contribuído para a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* observada no presente estudo. Por outro lado, Silva et al. (2006) e Velázquez et al. (2007) verificaram correlação inversa entre a capacidade de sequestro de radicais DPPH e atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Em conjunto, fica evidenciado que não é possível fazer associação direta entre o conteúdo de fenólicos e flavonoides ou atividade antioxidante com ação antimicrobiana. Portanto, apesar dos menores conteúdos de flavonoides pode-se sugerir uma composição química diferenciada para a própolis de Urupema que deve conter compostos não flavonoídicos com elevada atividade antimicrobiana.

Dessa forma, tem-se atribuído as diferenças de atividade entre extratos às variações quantitativa e qualitativa da sua composição química. Tais diferenças são em parte explicadas pela flora no entorno do apiário que é a fonte de resina para as abelhas elaborarem a própolis. Tem-se observado que modificações na vegetação acarretam em mudanças na composição da própolis e, por sua vez, em suas propriedades químicas e atividades biológicas (Velázquez et al., 2007;

Chaillou & Nazareno, 2010). Como pode haver mudança da flora do local segundo as estações do ano tem-se verificado que em algumas estações o conteúdo de fenólicos e flavonoides é menor, acarretando também na queda do potencial antimicrobiano do extrato (Castro et al., 2007). Para a própolis catarinense, estudos anteriores observaram que o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides e a composição química em geral, também diferem, não só em função da localização geográfica como também da sazonalidade estacional (Zeggio et al., 2012 a,b). No entanto, é interessante notar que em alguns casos uma alta atividade bactericida pode não estar relacionada ao conteúdo de fenólicos e flavonoides, como para os extratos hidroalcoólicos da própolis do nordeste brasileiro contra *Streptococcus mutans* (Castro et al, 2010). Da mesma forma, Santana et al. (2012) verificaram atividade antimicrobiana similar a encontrada no presente estudo, de própolis com menores teores de flavonóides e fenólicos (2,4 e 7,7 mg/g, respectivamente). Nestes casos, tem-se atribuído as atividades biológicas a presença de terpenóides e derivados prenilados do ácido p-cumárico (Bankova et al., 1995; Silva et al., 2006).

A despeito dos resultados encontrados para *S. aureus*, independente da região de origem, todos os extratos de própolis estudados demonstraram fraca ação contra *E. coli* (Figura 6; Tabela 3) e não houve diferença na redução de crescimento bacteriano em concentrações inferiores à 500 µg/mL. Nesta concentração, o extrato de Minas Gerais reduziu significativamente o crescimento bacteriano em 2 log<sub>10</sub> (P<0,05). Já o crescimento bacteriano na presença dos demais extratos não diferiu do controle nessa mesma concentração. Somente nas maiores concentrações testadas (750 e 1000 µg/mL) houve redução da contagem bacteriana dos grupos tratados com os extratos comparados ao controle (P<0,001), não tendo sido encontrada diferença entre os extratos (Figura 6B), independente do tempo de contato. Porém, mesmo havendo redução, a contagem bacteriana ainda ficou muito alta em se tratando de bactéria tão patogênica quanto *E. coli*. Concentrações mais altas não foram testadas em função da possível toxicidade que representaria para as células da glândula mamária.

A menor atividade da própolis contra *E. coli* vem sendo descrita na literatura (Kujumgiev et al 1999; Sforcin et al., 2000; Pinto et al., 2001; Pepeljnjak e Kosalec 2004; Uzel et al. 2005; Packer & Luz, 2007). Velazquez et al. (2007), por exemplo, como no presente estudo, verificaram a ausência de efeito da própolis mexicana contra *E. coli* apesar da ação bactericida contra *S. aureus*. O conteúdo lipídico e a



maior complexidade química da parede celular das bactérias Gram-negativas tem sido considerados os fatores limitantes para a atividade da própolis (Sforcin et al., 2000).

Tabela 3. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL Log<sub>10</sub>) de *E. coli* ATCC 8739 e 2 isolados de campo (média ± desvio padrão), a partir de inóculo inicial de 10<sup>5</sup> UFC/mL, frente a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis provenientes de 3 regiões de Santa Catarina e de própolis verde de Minas Gerais.

<b>Concentração o µg/mL</b>	<b>Minas Gerais UFC/mL Log<sub>10</sub></b>	<b>São Joaquim Log<sub>10</sub></b>	<b>Urupema Log<sub>10</sub></b>	<b>Água Doce Log<sub>10</sub></b>
<b>0</b>	5,0±0,0Bb	5,0±0,0Bb	5,0±0,0Bb	5,0±0,0Bb
<b>250</b>	5,0±0,0Bb	5,0±0,0Bb	5,0±0,0Bb	5,0±0,0Bb
<b>500</b>	3,96±0,5Aa	4,58±0,5Bb	4,38±0,5Bb	4,23±0,6Bb
<b>750</b>	3,64±0,2Aa	3,69±0,2Aa	3,53±0,3Aa	3,27±0,5Aa
<b>1000</b>	3,37±0,4Aa	3,62±0,2Aa	3,33±0,5Aa	2,50±1,3Aa

Os valores médios representam as contagens realizadas com 6 e 24 h de contato.\*Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam as diferenças significativas entre os extratos de própolis. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam as diferenças significativas entre as concentrações de um mesmo extrato (P<0.05).

Quanto ao tempo de contato, não foram observadas diferenças entre 6 e 24 h porque, enquanto o efeito sobre o crescimento bacteriano foi mais bem visualizado em 24 h, quando havia pouca redução de crescimento, as contagens bacterianas em 24 h de contato eram superiores à contagem em 6 h, principalmente no crescimento de *E. coli*, que tem rápido crescimento.

Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994) verificaram que a própolis inibe o crescimento bacteriano por prevenir a divisão celular, resultando em formas pseudo-multicelulares, além de desorganizar o citoplasma, a membrana plasmática e a parede celular, causando ainda bacterólise parcial e inibição da síntese de proteínas. Portanto, segundo os autores, o mecanismo de ação da própolis não se classifica nos modos de ação descritos classicamente para antibióticos. Esse pode ser um dos motivos pelos quais as doses sub-letais não levariam a resistência bacteriana (Santana et al., 2012).

Em relação aos resultados das concentrações de própolis mais efetivas como antimicrobianos são encontrados na literatura resultados

muito divergentes. As concentrações bactericidas variam desde 400 mg/mL, conforme relatado por Velazquez et al. (2007), até concentrações muito baixas, entre 15,3 e 49,1 µg/mL, relatadas por Moreno et al. (1999) utilizando própolis de diferentes regiões da Argentina. Para própolis vermelha esses valores variam entre 25 a 50 µg/mL (Alencar et al., 2007). Estas divergências estão relacionadas, em parte, às diferenças na composição química e vegetação de origem, que conferem características peculiares (típicas) à própolis, mas também a outros fatores como o método de extração, purificação e veículo para solubilização que podem afetar a biodisponibilidade dos compostos. Como o presente estudo visou à utilização de própolis como uma tecnologia popular, preconizou-se a forma mais usual, a solução etanólica, para obtenção dos compostos bioativos. Além disso, o veículo e a concentração utilizada precisam ser adequados ao propósito de aplicação intramamária. Santana et al. (2012) utilizando um método de extração semelhante ao realizado no presente estudo verificaram a inibição de crescimento de *S. aureus* tratadas com própolis verde de Minas Gerais em concentrações de até 500 µg/mL e efeito bactericida com 1000 µg/mL.

Na avaliação de atividade antimicrobiana, quando se utiliza um produto natural que atua de forma complexa, como a própolis, uma redução da carga infectante é um achado muito importante, uma vez que seus compostos não levam a mudanças na sensibilidade bacteriana ao longo do tempo. Isso foi demonstrado por Santana et al. (2012) ao avaliar 60 gerações de cultivo de cepa de *S. aureus* submetidas a doses sub-letais de extrato de própolis.

Além disso, a despeito dos diversos estudos com a própolis verde, oriunda de regiões de Minas Gerais, reconhecida por suas propriedades medicinais (Shimizu et al., 2004; Tani et al., 2010; Cheung et al., 2011; Bachiega et al., 2012), o presente trabalho mostra que alguns extratos de própolis considerados típicos de Santa Catarina, apresentam atividade antimicrobiana similar, principalmente aqueles produzidos nas regiões de elevada altitude (Urupema e São Joaquim). Esses achados revelam grande potencial de uso medicinal e corrobora com o uso empírico que já vem sendo feito há tempos por produtores leiteiros (Medeiros, 2001), uma vez que foi efetiva sobre os principais agentes etiológico de mastite (Sabour et al., 2004).

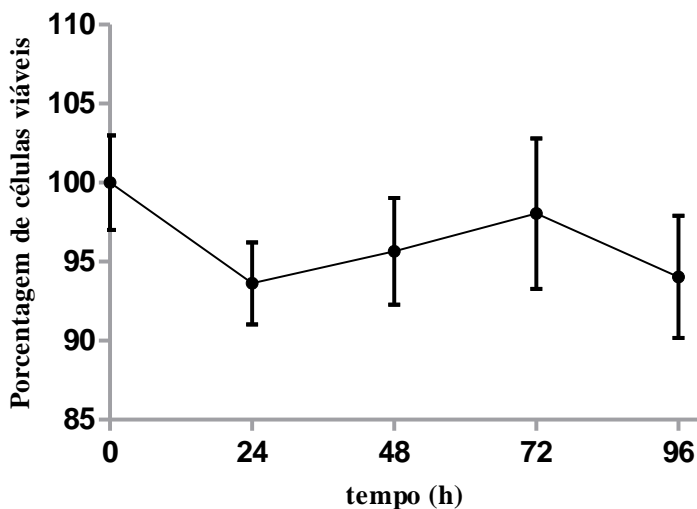
A redução bacteriana acarretada pelo uso destes extratos já significa um auxílio para que o sistema imune do animal possa também atuar contra a infecção, considerando as propriedades imuno-

estimulantes da própolis relatadas em outros trabalhos (Fisher et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Bachiega et al., 2012). Destaca-se também a indicação de todas as amostras, desde que na concentração adequada, como antisséptico para uso no pré e pós- dipping, uma vez que esta é uma medida preventiva que ajuda a diminuir os casos de mastite ou de alastramento da doença no rebanho. Contudo, ressalta-se a importância de novos estudos avaliando a aplicação segura de doses intramamárias *in vivo* em casos de mastite clínica e sub-clínica. O presente trabalho propõe um método inovador *in vitro*, apresentado a seguir, que auxiliará na determinação de doses e escolha de produtos com potencial uso no tratamento de enfermidades da glândula mamária bovina.

### **5.3 Ensaio com explantes da glândula mamária bovina**

#### **5.3.1 Viabilidade ao longo do tempo**

Para padronização do tempo de cultivo dos explantes da glândula mamária, procedeu-se com um estudo da sua viabilidade ao longo de 4 dias, não tendo sido encontrada queda significativa no período estudado e nas condições de cultivo utilizadas (Figura 7). Esses achados corroboram os resultados de Baumrucker & Stemberger (1989) que demonstraram que as funções específicas do tecido mamário podem ser conservadas em cultivo por um período significativo de 96 h. No presente estudo, estes resultados além de validarem o modelo experimental proposto, permitem supor que outros tipos de ensaios, como investigação da atividade anti-inflamatória possam ser realizados. De acordo com Basso & Bracarense (2013), a manutenção da viabilidade celular durante o tempo de cultivo é o principal entrave para o desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro*. Mesmo ao mimetizar as condições *in vivo*, o tecido inevitavelmente poderá ser submetido à hipóxia.



**Figura 7.** Viabilidade dos explantes de glândula mamária bovina em função do tempo de cultivo. Resultados expressos em porcentagem de células viáveis ( $P < 0,05$ ).

O aprimoramento de técnicas de cultivo de tecidos animais ainda é um desafio para a ciência que tem sido cada dia mais demandada pela sociedade e organizações governamentais. No entanto, a garantia da eficácia destes modelos é essencial para o desenvolvimento de pesquisas deste tipo (Bansal et al., 2009; Randall et al., 2011). O anseio ético da sociedade pela busca de alternativas que minimizem o uso de animais em estudos científicos tem justificado o desenvolvimento de muitos desses testes. Deste modo, a padronização de um modelo *in vitro*, de análise da glândula mamária bovina, representa um avanço fundamental na direção deste propósito.

### 5.3.2 Efeito dos extratos de própolis sobre a viabilidade dos explantes da glândula mamária bovina

Os resultados dos ensaios de efeito dos diferentes extratos de própolis sobre a viabilidade dos explantes da glândula mamária bovina estão mostrados na Tabela 4. O extrato de própolis de Água Doce foi o que apresentou menor toxicidade, tendo sido observada maior

porcentagem de células vivas em todas as concentrações testadas, exceto na maior concentração (560 µg/mL), quando houve redução de aproximadamente 80% das células viáveis. De fato, para esse extrato, a viabilidade dos explantes começou a reduzir somente a partir de 280 µg/mL (Tabela 4). É interessante notar que este mesmo extrato, mesmo apresentando alto conteúdo de fenólicos e intermediário de flavonoides (Tabela 1) mostrou a menor atividade bactericida frente a cepas de *S. aureus* (Tabela 2). Já os explantes expostos aos extratos de própolis de Minas Gerais apresentaram o menor percentual de células com atividade mitocondrial, com redução a partir da menor concentração testada (17,5 µg/mL). Similarmente, o extrato de São Joaquim mostrou-se citotóxico em baixas concentrações, a partir de 70 µg/mL. Estes dois extratos destacaram-se por exibirem os maiores teores de flavonoides e pela alta atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*. Esses resultados sugerem que o efeito antimicrobiano exercido pelos flavonoides é acompanhado pela citotoxicidade às células do úbere bovino. O extrato de Urupema, por sua vez, apresentou citotoxicidade intermediária, reduzindo o número de células viáveis para cerca de 50% a partir da concentração de 140 µg/mL (Tabela 4). É interessante notar que este extrato foi o que apresentou o menor conteúdo de flavonoides e atividade antioxidante (Tabela 1), e ainda assim um bom desempenho nos ensaios antimicrobianos contra *S. aureus* (Tabela 2/ Figura 6).

Na literatura, a síntese dos flavonoides pelas plantas tem sido associada a uma resposta ao estresse ambiental e infecções microbianas. Dessa forma, estes têm sido reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e também antioxidantes (Bankova, 2005). Thirugnanasampandan et al. (2012) atribuíram a presença majoritária do flavonoide quercetina a ação citotóxica da própolis indiana sobre células cancerígenas e saudáveis de pulmão. Portanto, o trabalho evidencia a hipótese sugerida no presente estudo de que os flavonoides exercem uma ação tóxica tanto sobre os microorganismos quanto sobre células saudáveis. A presença de quercetina na própolis do Brasil e a investigação do seu potencial terapêutico já haviam sido relatadas na literatura. Park et al. (2002) e Shimizu et al. (2011), por exemplo, afirmam que este composto está entre os principais flavonoides presentes em amostras de própolis brasileira e Meneghelli et al. (2013) associaram a presença deste flavonoide a um potencial anti-angiogênico demonstrado *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 4. Viabilidade dos explantes da glândula mamária bovina\* após exposição a diferentes concentrações de extratos de própolis de Minas Gerais, São Joaquim, Urupema e Água Doce por 48 horas.

<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Minas Gerais</b>	<b>São Joaquim</b>	<b>Urupema</b>	<b>Água Doce</b>
<b>0</b>	100 ± 9,47Aa	100 ± 6,87Aa	100 ± 6,45Aa	100 ± 6,10Aa
<b>DMSO</b>	97 ± 8,59 Aa	101 ± 5,52Aa	98 ± 9,09Aa	97 ± 3,93 Aa
<b>17.5</b>	35 ± 19,27Bb	88 ± 9,31 Aa	89 ± 5,91Aa	91 ± 6,73 Aa
<b>35</b>	28 ± 15,04Bb	75 ± 14,06Aa	87 ± 10,31Aa	89 ± 10,23Aa
<b>70</b>	15 ± 2,86 Cb	43 ± 12,76 Bb	80 ± 6,55 Aa	82 ± 12,46Aa
<b>140</b>	15 ± 1,89 Cb	19 ± 4,88Cc	58 ± 11,79Bb	77 ± 8,68 Aa
<b>280</b>	16 ± 0,83 Bb	18 ± 2,89Bc	26 ± 9,68Bc	46 ± 10,77Ab
<b>560</b>	15 ± 2,46 Ab	16 ± 2,25Ac	16 ± 2,32Ac	22 ± 7,20Ac

\*Os resultados estão expressos em porcentagem de células viáveis ± desvio padrão. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os extratos de própolis. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam as diferenças significativas entre as concentrações de um mesmo extrato (Tukey, P<0,05).

Posteriormente, a partir de uma análise de regressão não linear, determinou-se a dose inibitória máxima ( $IC_{50}$ ) dos extratos de própolis analisados, sendo esta a concentração capaz de reduzir a 50% a viabilidade dos explantes de glândula mamária bovina (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração Inibitória máxima ( $IC_{50}$ ) dos extratos de própolis de Minas Gerais, São Joaquim, Urupema e Água Doce frente à explantes de glândula mamária bovina.

	<b>São Joaquim</b>	<b>Minas Gerais</b>	<b>Água Doce</b>	<b>Urupema</b>
<b>IC<sub>50</sub></b>	63,85	13,23	272,4	171,8
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
<b>DP</b>	1,55	0,76	5,21	3,26

Os resultados encontrados estão de acordo com os descritos na literatura para o uso da própolis como agente citotóxico frente a células normais e tumorais. Zizic et al. (2013) avaliando a citotoxicidade de extratos de própolis sobre linhagens de células cancerígenas de cólon humano, registraram  $IC_{50}$  variando entre 26,33 e 143,09 µg/mL. Todavia, o comportamento da própolis pode ser diferente sobre células cancerígenas e células normais. Em carcinomas de bexiga, o extrato etanólico de própolis em concentrações de 75 µg/mL inibiu a proliferação de células tumorais, enquanto concentrações de até 300 µg/mL não tiveram efeito citotóxico em células epiteliais normais (Orsolich et al., 2009). Por outro lado, uma avaliação de própolis portuguesa mostrou doses citotóxicas muito próximas para células tumorais e normais, porém, houve uma grande variação (entre 9 e 182 µg/mL) da  $IC_{50}$  entre amostras de diferentes regiões e entre os tipos de carcinomas (Calhelha et al., 2014). Thirugnanasampandan et al. (2012) também perceberam este padrão ao avaliar a citotoxicidade da própolis sobre células sadias e cancerígenas de pulmão. Enquanto sobre células cancerígenas os autores encontraram uma  $IC_{50}$  de 13 µg/mL, frente a células normais a  $IC_{50}$  foi de 10 µg/mL.

Além do aumento da letalidade celular proporcional ao aumento da concentração, é possível que ocorram alterações genotóxicas nos processos metabólicos celulares após a aplicação de extratos de própolis sobre as células. Montoro et al. (2012) registraram redução no índice mitótico e proliferação de linfócitos periféricos humanos, além de trocas de cromátides irmãs, após exposição a crescentes concentrações de própolis variando de 0 à 2000 µg/mL.

O efeito citotóxico, provavelmente, está intimamente relacionado a composição química da amostra (Zizic et al., 2013) e em função do solvente extrator (Banskota et al., 2001). Os extratos metanólicos possuem maior citotoxicidade que os extratos aquosos sobre células de cólon murino, carcinoma humano e fibrocarcinoma, possivelmente, pelo fato do solvente orgânico ter extraído mais substâncias com maior potencial citotóxico (Banskota et al., 2001).

O presente estudo revelou que as concentrações antimicrobianas são tóxicas para os explantes da glândula mamária, i.e., a maior atividade antimicrobiana é acompanhada pela maior citotoxicidade. Contudo, dentre os extratos analisados, o de Urupema possui bom desempenho antimicrobiano contra *S. aureus* e citotoxicidade moderada ( $IC_{50} = 171,8 \mu\text{g/mL}$ ), reduzindo nesta concentração a população bacteriana de  $10^5$  para aproximadamente  $10^4$  UFC/mL. Deste modo é possível sugerir a investigação do seu uso no controle de mastite subclínica ou durante a terapia de vaca seca (quando a carga bacteriana é menor) em estudos futuros.

A utilização dos demais extratos no controle da mastite bovina também não pode ser descartada, considerando a elevada atividade antimicrobiana encontrada. Visando a aplicação intramamária, poder-se-ia ainda testar frações purificadas desses extratos, contendo compostos isolados ou extratos menos complexos. Desse modo, seria possível verificar se os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana são também os responsáveis pela citotoxicidade às células do úbere. Moreno et al. (2005) avaliando o potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e antimutagênico da própolis argentina utilizando como modelo *Artemia salina*, encontraram um  $IC_{50}$  de  $100 \mu\text{g/mL}$ . Entretanto, esta dose não foi suficientemente tóxica para o controle de cepas de *Salmonella typhimurium*. Quando analisado isoladamente o componente majoritário do extrato (o flavonoide 2,4 dihidroxichalcona) a  $IC_{50}$  diminuiu para  $0,5 \mu\text{g/mL}$ . Apesar disso, o extrato nesta dose mostrou um potente efeito antimicrobiano contra bactérias gram-negativas, antimutagênico e deste modo com alta atividade anticarcinogênica. O uso da nanotecnologia pode ser também em curto prazo, um aliado nas pesquisas utilizando própolis. Troncarelli et al. (2013), por exemplo, estão trabalhando no desenvolvimento da nanoprópolis, que em breve estará disponível em escala comercial. A técnica consiste no nanoencapsulamento dos compostos ativos da própolis e acredita-se que este produto poderá ter efeito menos tóxico do que os extratos.



Devido à divergência entre as doses antimicrobianas e citotóxicas encontradas no presente trabalho, ressalta-se a importância de estudos futuros objetivando aplicações *in vivo* conciliando as doses antimicrobianas efetivas e pouco citotóxicas. Ressalta-se que o tratamento com própolis pode ser administrado durante a lactação, sem a necessidade de descartar o leite e sem o risco de indução à resistência por sub-doses. Todavia, é necessário, de imediato, o refinamento dos ensaios antimicrobianos a fim de testar diluições seriadas do inóculo para determinar a redução exata do crescimento e examinar populações de inóculo menores representando situações de mastite subclínica. Estes resultados garantirão segurança para propor um ensaio *in vivo*, uma vez que, os poucos estudos com extratos de própolis em vacas leiteiras demonstraram aumento da CCS, indicando que a aplicação intramamária deva ser feita com muita cautela, uma vez que pode ocorrer uma atividade pró-inflamatória local (Pereira & Botteon, 2008).

Neste sentido, os estudos sobre explantes mamários trazem uma segurança maior no desenvolvimento de produtos alternativos para o tratamento de enfermidades do úbere, e deveriam ser amplamente adotados como ensaios anteriores aos ensaios *in vivo*, principalmente por questões relacionadas ao bem-estar animal. A maioria dos estudos, objetivando o controle de mastite bovina, é feita em modelos *in vitro* utilizando microrganismos e células isoladas ou *in vivo* utilizando ratas (Diarra et al., 2013; Wei et al., 2014). Em ambas as situações existe a limitação de extrapolação dos resultados obtidos nestes testes para real ação dos produtos nos animais de interesse. O desenvolvimento de um modelo *in vitro* de análise da citotoxicidade em cultura de tecido é fundamental para o avanço em pesquisas nesta área. A complexidade de relações entre as células e seu metabolismo nos tecidos, mimetizam com maior precisão o que ocorre no órgão e desta forma permite que se selecione previamente, com maior garantia, produtos com potencial ativo e que se determine doses eficazes, reduzindo assim a demanda por animais em pesquisas.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo indicou que os extratos de própolis oriundas dos municípios catarinenses de Água Doce, Urupema e São Joaquim, e de Minas Gerais possuem teores moderados a elevados de fenólicos totais e flavonoides, o que confere a estas amostras um alto potencial antioxidante e de uso terapêutico. Neste sentido, os extratos mostraram elevada atividade antibacteriana contra *S. aureus*, porém, não são indicados para tratamento de mastite causada por *E.coli*, já que um efeito antimicrobiano satisfatório ocorre somente em concentrações extremamente tóxicas à glândula mamária. Apesar dos conteúdos de flavonoides colaborarem para ação antimicrobiana dos extratos, notou-se que outros compostos presentes nos extratos possuem mesmo efeito, uma vez que a amostra de Urupema, apesar da menor concentração de flavonoides, exibiu potencial bactericida semelhante aos demais. Esta informação aponta para uma composição diferenciada deste extrato. Além disso, apesar de todos os extratos reduzirem o crescimento bacteriano de *S. aureus*, verificou-se uma grande lacuna entre a dose antimicrobiana efetiva e a concentração que não cause diminuição na viabilidade das células da glândula mamária bovina. Deste modo, a padronização de um modelo *in vitro* utilizando fragmentos de tecido mamário bovino, além de ser fundamental para o desenvolvimento de alternativas que reduzam a demanda de animais em pesquisas também contribuem para a determinação prévia de substâncias e concentrações. Desse modo, a união entre os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e antimicrobianos destacaram a própolis oriunda de Urupema com potencial no tratamento de mastite subclínica ou durante a terapia de vaca seca, quando a carga bacteriana é menor. Este é um importante avanço na busca por alternativas ao controle desta enfermidade, principalmente em função da dificuldade de tratamento de mastites causadas por *S. aureus* no período de lactação e até mesmo as mastites no período seco, da crescente resistência aos antibióticos convencionais e do alto custo com o descarte do leite.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL HADY, F.K. & HEGAZI, A.G. **Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis.** Zeitschrift für Naturforschung C, vol. 57 p. 386-394, 2002.

AGÜERO, M.B.; GONZÁLEZ, M.; LIMA, B.; SVETAZ, L; SÁNCHEZ, M.; ZACCHINO, S.; EGLY FERESIN, G.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PALERMO, J., WUNDERLIN, D.; TAPIA, A. **Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 58, p. 194-201, 2010.

AGUIAR, S.C.; ZEOULA, L.M.; FRANCO, S.L.; PERES, L.P.; ARCURI, P.B.; FORANO. **Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 29, p.1951–1959, 2013.

AHN, M., KUMAZAWA, S.; USUI,Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. **Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China.** Food Chemistry, vol. 101, p. 1383–1392, 2007.

ALCARAZ, L.E.; BLANCO, S.E.; PUIG, O.N.; FERRETI, F.H.; TOMAZ, F. **Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** Theoretical Biology, vol. 205, n.1, p. 231-240, 2000.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis.** Journal of Ethnopharmacology, Lausanne, vol. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALLUWAIMI, A.M.; LEUTENEGGER, C.M.; FARVER, T.B.; ROSSITTO, P.V.; SMITH, W.L.; CULLOT, J.S. **The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland.** Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, vol. 50, p. 105–11, 2003.

ATAKISI, O.; ORAL, H.; ATAKISI, E.; MERHAN, O.; PANCARCI, S. M.; OZCAN, A.; MARASLI, S.; POLAT, B.; COLAK, A.; KAYA, S. **Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and oxidant capacity in cow milk.** Research in Veterinary Science, vol. 89, p. 10-13, 2010.

BACHIEGA, T. F.; ORSATTI, C. L.; PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M. **The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages.** Phytotherapy Research, vol. 26, p. 1308-1313, 2012.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. **Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis.** Zeitschrift Naturforschung, Tübingen, vol. 50, p. 1-6, 1995.

BANKOVA, V. S. & MARCUCCI, M. C. **Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state.** Zeitschrift für Naturforschung, vol. 54, p. 401-405, 1999.

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

BANKOVA, V. S. **Recent trends and important developments in propolis research.** Evidence Based Complementary Alternative Medicine. vol. 2, p.29-32, 2005.

BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y., KADOTA, S. **Recent progress in pharmacological research of propolis.** Phytoterapy Research, vol. 15, p. 561-571, 2001.

BANSAL, D.; AVE, P.; KERNEIS, S.; FRILEUX, P.; BOCHE, O.; BAGLIN, A. C.; DUBOST, G.; LEGUERN, S.; PREVOST, M. C.; BRACHA, R.; MIRELMAN, D.; GUILLE, N. N.; LABRUYE, R. E. **An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis.** PLOS Neglected Tropical Diseases, New York, v. 3, n. 11, p. 1-11, 2009.

BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M.; SILVA, M. H. **Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de Salvador.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, vol. 2, nº3, p. 69-73, 2001.

BASSO, K. M. & BRACARENSE, A. P. F. R. L. **Explantos teciduais: um modelo redescoberto na experimentação animal.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3951-3958, 2013.

BAUMRUCKER, C.R. & STEMBERGER, B.H. **Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue *in vitro*.** Journal of Animal Science, vol. 67, p. 3503–3514, 1989.

BONVEHI, J.S. & GUTIERREZ, A. L. **Antioxidant activity and total phenolics of propolis from Basque Country (Northeastern Spain).** Journal of American Oil Chemistry's Society, vol. 88, p. 1387-1395, 2011.

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

BORRELLI, F.; MAFFIAA, P.; PINTOA, L.; IANAROA, A; RUSSOB, A.; CAPASSOA, F; IALENTIA, A. **Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract.** Fitoterapia, vol. 73 Suppl. 1 p.53–63, 2002.

BOUDJELLAB, N.; CHAN-TANG, H.S.; LI, X.; ZHAO, X. **Interleukin 8 response by bovine mammary epithelial cells to lipopolysaccharide stimulation.** American Journal of Veterinary Research, vol. 59, p. 1563–1567, 1998.

BOULANGER, V.; ZHAO, X.; LACASSE, P. **Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage.** Journal of Dairy Science, vol. 85, p.562–569, 2002.

BRADLEY, A. J. **Bovine Mastitis: An Evolving Disease**. The Veterinary Journal, nº 164, p. 116-128, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (2001). Instrução Normativa nº 3 Anexo VII- Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de extratos de própolis. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Conselho Nacional de Controle de experimentação animal. Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. 2008.

BUENO, V. F. F. **Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga, SP, Brasil**. Revista de Patologia Tropical, v. 32, n. 1, p. 33-44, 2003.

BYATT, J. C. & R. D. BREMEL. **Lactogenic effect of bovine placental lactogen on pregnant rabbit but not pregnant heifer mammary gland explants**. Journal of Dairy Science, p. 2066-2069, 1986.

CABRAL, I.S.R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antimicrobiana da própolis vermelha Brasileira**. Dissertação de mestrado em Ciências na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

CALHELHA, R.C.; FALCÃO, S.; QUEIROZ, M.J.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. **Cytotoxicity of portuguese propolis: the proximity of the *in vitro* doses for tumor and normal cell lines**. Biomedicine Research International, vol. 1, 2014.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; KOO, H.; DUARTE, S. **A própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antimicrobiana e composição fenólica**. Química Nova, vol. 30, n.7, p. 1512-1516, 2007.

CHAILLOU, L.L. & NAZARENO, M.A. **Bioactivity of propolis from Santiago del Este, Argentina, related to its chemical composition.** Food Science and Technology, vol. 42, p. 1422-1427, 2009.

CHEN, H.; MO, X.; YU, J.; HUANG, Z. **Alpinetin attenuates inflammatory responses by interfering toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice.** International Immunopharmacology, vol. 17, n. 1, p. 26-32, 2013.

CHEUNG, K.W.; SZEB, D. M.Y.; CHANA, W. K.; DENG, R.X.; TUA, W.; CHANA, G. C.F. **Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 138, p.463– 471, 2011.

CHOI, J.S., JUNG, M.J.; PARK, J.; CHUNG, H.Y.; KANG, S.S. 2002. **Further isolation of peroxyxynitrite and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging isorhamnetin 7-O-glucoside from the leaves of Brassica juncea L.** Archives of Pharmacal Research, v. 25, n. 5, p. 625-627, 2002.

COLLIER, R.J.; McNAMARA, J.P.; WALLACE, C.R.; DEHOFF, M.H. **A review of endocrine regulation of metabolism during lactation.** Journal of Animal Science, vol. 59, n. 2, 1984.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**, 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 770 p.

CUSHNIE, T.P. & LAMB, A.J. **Antimicrobial activity of flavonoids.** International Journal of Antimicrobial Agents 26: 343-356. 2005.

DIARRA, M.S.; BLOCK, G.; REMPEL, H.; OOMAH, D. B.; HARRISON, J.; MCCALLUM, J.; BOULANGER, S.; BROUILLETTE, E.; GATTUSO, M.; MALOUIN, F. **In vitro and in vivo antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or in combination with  $\beta$ -lactams against *Staphylococcus aureus*.** BMC Complementary & Alternative Medicine, vol. 13, n.1, p. 90-114, 2013.

DIAZ, M. A. N., ROSSI, C.C., MENDONÇA, V. R., SILVA, D.M., RIBON, A.O.B., AGUILAR, P.A., MUÑOS, G. D. **Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis.** Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 20, nº5, p. 724-728, 2010.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 813 p.

ERSKINE, R. J.; EBERHART, R.J.; GRASSO, P. J.; SCHOLZ, R. W. **Induction of *Escherichia coli* mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diets.** Animal Journal of Veterinary Research, vol. 50, n.12, p. 2093-2100, 1989.

ERSKINE, R. J.; EBERHART, R.J.; SCHOLZ, R. W. **Experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in selenium-deficient and selenium-supplemented dairy cows.** Animal Journal of Veterinary Research, vol. 51, n.5, p. 1107-1111, 1990.

FERREIRA DE LIMA, M.R.; XIMENES, E.C.P.A.; LUNA, J.S.; SANTANA, R. **The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants.** Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 16, n. 3, p. 300-306, 2006.

FERREIRA, L. N. **Immunomodulatory capacity of ethanolic extract of green propolis and aqueous extract of brown propolis in mice inoculated with multiple antigens.** 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

FEUERMAN, Y.; MABJEESH, S.J.; NIV-SPECTOR, L.; LEVIN, D.; SHAMAY, A. **Prolactin affects leptin action in the bovine mammary gland via the mammary fat pad.** Journal of Endocrinology, vol. 191, p. 407-413, 2006.

FILIPPSEN, L. F., MOREIRA, F. B., SAKASHITA, A. T., BITTENCOURT, D. R.; **Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros na região norte do Paraná.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 87-89, 1999.



FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. **Imunomodulação pela própolis**. Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo, vol.75, n.2, p.247-253, 2008.

FOLLY, M.M.; MACHADO, S.C.A. **Determinação de resíduos antibióticos, utilizando métodos de inibição microbiana, enzimático e imunoensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Ciência Rural, v.31, nº1, p.95-98, 2001.

FONSECA, G.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SIL, R.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J. **Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study**. Ciência e tecnologia em Alimentos, vol. 29, nº 2, p. 451-453, 2009.

FONSECA, L. F. L.& SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo**. Lemos Editorial, p.39-141, 2000.

GHASEM, Y.B., OWNAGH, A. and HASANLOEI, M. **Antibacterial and antifungal activity of Iranian propolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans***. Journal of Biology Science. vol.10, p.1343-13455, 2007.

GOLDBERG, I.H. **Mode of action of antibiotics**. The American Journal of Medicine, vol. 39, n.5, p. 722-752, 1965.

GRANGE, J.M. & DAVEY, R.W. **Antibacterial properties of própolis (bee glue)**. Journal of Royal Society of Medicine, vol. 83, p. 159-160, 1990.

GREGORIS, E., FABRIS, S., BERTELLE, M., GRASSATO, L., STEVANATO, R.. **Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties**. International Journal of Pharmacology, vol. 405, p. 97–101, 2011.

GULCIN, I., BURSAL, E., SEHITOGLU, M.H., BILSEL, M., GOREN, A.C., **Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey**. Food Chemistry and Toxicology, vol. 48, p. 2227–2238, 2010.

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

HARBORNE, J.B. **Classes and functions of secondary products,** In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products.** London: Imperial College, p.1-25. 1999.

HARMON, R. J. **Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts.** Journal of Dairy Science, vol. 77, p. 2103- 2112, 1994.

HEGAZI, A.G.; EL HADYB, F. K. A.; ABD ALLAH, F. A. M. **Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis.** Zeitschrift für Naturforschung, vol. 55, p. 7 0 -7 5, 2000.

HUYNH, H.T., ROBITAILLE, G., TURNER, J., **Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an *in vitro* model for bovine lactation.** Experimental Cell Research, vol. 197, p. 191–199, 1991.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais** (1 de julho de 2008). Acesso em 25 de Janeiro de 2015.

IMAGAWA, W.; YANG, J.; GUZMAN, R.; NANDI, S. In: KNOBIL, E., NEIL, J.D.; eds, **Control of Mammary Gland Development.** Raven Press, New York, NY, 1033–1063, 1994.

KALOGEROPOULOS, N, KONTELES, SJ, TROULLIDOU, E, MOURTIZINOS, I, KARATHANOS, VT. **Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus,** Food Chemistry, v.116, n.2, p.452-461, 2009.

KEDZIA, B.; GEPPERT, B.; IWASKIEWICZEWICZ, J. **Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis.** Phytotherapie, vol. 6, p.7 – 10. 1990.

KORNALIJNSLIJPER, J.E; DAEMEN, A.J.J.M; VAN WERVEN, T.; NIEWOLD, T.A.; RUTTEN, V.P.M.G; NOORDHUIZEN-STASSEN,

**E.N. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows.** Veterinary Microbiology, vol. 101, n. 3, p. 177-186, 2004.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHOSTOV, R.; POPOV, S. **Antimicrobial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 64, p. 235–240, 1999.

LAM, J.G.; VANDEM BORNE. B.H.R; JANSEN, J.; HUIJPS, K.; VAN VEERSEN, J.C.L.; VAN SCHAIK, G.; HOGEVEEN, H.; **Improving bovine udder health: a national mastitis control program in the Netherlands.** Journal of Dairy Science, vol. 96, n. 2, p. 1301–1311, 2013.

LAUZON, K.; ZHAO, X.; LACASSE, P. **Deferoxamine Reduces Tissue Damage During Endotoxin-Induced Mastitis in Dairy Cows.** Journal of Dairy Science, vol. 89, n.10, p. 3846-3857, 2006.

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

LU, L.C.; CHEN, Y. W.; CHOU, C.C.; **Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*.** International Journal of Food Microbiology, vol. 102, p. 213– 220, 2005.

MALUF DA SILVA, R.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. **Resíduos de antibióticos em leite.** SaBios: Revista da Saúde e Biologia, v.7, n.1, p.30-44, 2012.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO , V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; FONSECA, M.J. **Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 39, n.3/4, p.455-462, 2005.

MARTINS, J.G.P. **Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão.** Segurança Alimentar e Nutricional, vol. 18, nº 2, p. 80-87, 2011.

MDEGELA, R.H.; RYوبا, R. E; KARIMURIBO, D.; PHIRI, E.J.; LOKEN, T.; REKSE, N O.; MTENGETI, E.; URIO, N.A. **Prevalence of clinical and subclinical mastitis and quality of milk on smallholder dairy farms in Tanzania.** Journal of the South African Veterinary Association, vol 80, No 3, p. 163-168, 2009.

MEDEIROS, M. I. M.; SOUZA, L. C. **Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da região de Cerqueira César SP.** Ciência e Agrotecnologia, vol. 33, p. 34, 2009.

MEDEIROS, N. G. A. **Tratamento de mastite bovina com própolis verde produzida no estado de Minas Gerais.** Viçosa, Minas Gerais, 74p. 2001.

MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L.S.D.; FELIX, G.L.Q.; ZEGGIO, A.R.S.; TOMAZZOLI, M.; SILVA, D.A.; BERTI, F.V.; VELEIRINHO, M.B.R.; RECOUVREUX, D.O.S; ZERI, A.C.M.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. **Southern Brazilian autumnal própolis shows anti-angiogenic activity: *in vitro* and *in vivo* study.** Microvascular Research, vol. 88, p. 1-11, 2013.

MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLLEN, S. A.; CAVACO, A. M.; NATUNES, M. D. **Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal.** Food and Chemical Toxicology, vol. 48, p. 3418–3423, 2010.

MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. **Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*.** Journal of Applied Microbiology, vol.95, p.913-920, 2003.

MIROLYUBOV, M.G. & BARSKOV, A. A. **Propolis and mastitis.** N. 2 pp. 45-46, 1980.

MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. **The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response.** Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, vol. 55, n.6, 441-449, 1996.

MONTORO, A.; SORIANO, J.M.; BRAQUINERO, J.F.; ALMONACID, M.; VERDU, G.; SAHUQUILLO, V.; VILLAESCUSA, J.I.; SEBASTIA, N. **Assessment *in vitro* of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes.** Food and Chemistry Toxicology, vol. 50, 216-22, 2012.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; CUDMANI-NG, VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. **Screening of antibacterial activity of Amaicha delvalle (Tucuman, Argentine) propolis.** Ethnopharmacology, vol. 168, p. 97-102, 1999.

MORENO, M. I. N.; ZAMPINI, I. C.; ORDOAN, R. M.; JAIME, G. A.S.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M. **Evaluation of the Cytotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, and Antimutagenicity of Propolis from Tucuman, Argentina.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 53, p. 8957-8962, 2005.

MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; SHINKICHI, T. **Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*.** Phytochemistry, vol. 26, n.8, p. 2231-2234, 1987.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for growth and survival – application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods, vol.65, p.55-63, 1983.

MUKHERJEE, R.; DASH, P.K.; RAM, G.C. **Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis.** Research in Veterinary Science, vol. 79, p.37–43, 2005.

MÜLLER, U. & SAUERWEIN, H. **A comparison of somatic cell count between organic and conventional dairy cow herds in West Germany stressing dry period related changes.** Livestock Science, vol. 127, n. 1, p. 30-37, 2010.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P.; **Ocorrência de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP.** Revista Nutrição, vol. 14, n.2, p. 119-124, 2001.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELLOTI, V.; BARROS, M. A.F.; FRANCO, B.D.G.M. **Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, vol.27, n. 2, p. 391-393, 2007.

NICKERSON, S. **Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment an overview.** Veterinary Microbiology vol. 134, p.128–135, 2009.

ORSOLIC, N.; STARJCAR, D.J.; BASIC, I. **Propolis and flavonoids compounds on human urinary bladder transitional cell carcinoma in primary culture.** Period Biology, vol. 111, n.1, p.113-121, 2009.

PACKER, J.F. & LUZ, M.M.S. **Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural.** Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 17, p. 102-107, 2007.

PAGLIARONE, A. C. ORSATTI,; C. L.; BÚFALO, M. C.; MISSIMA, F.; BACHIEGA, T F.;. ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; SFORCIN, J. M. **Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice.** International Immunopharmacology, vol. 9 p. 1352–1356, 2009.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. **Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity.** Honeybee Science, vol. 21, p. 85-90, 2000.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. **Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal.** Ciência Rural, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PEPELJNJAK S, KOSALEC I. **Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*.** FEMS Microbiology Letters, vol. 1, p. 111-116, 2004.

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

PERES, L.A.B., DELFINO V.D.A., TUTIDA L.A., FARIS B.A., BARBOSA D.S., FAVERO M.E. **Efeitos do Ramipril, Captopril e Sinvastatina na Injúria da Preservação a Frio de Rins de Ratos.** Jornal Brasileiro de Nefrologia, vol. 31, n.1, p. 39-47, 2009;

PHILLIPSON, J.D. **Medicinal plants.** Journal of Biological Education, vol.31, n.2, p.109-115, 1997.

PHILPOT W.N. & NICKERSON S.C. **Mastitis counters attack: A strategy to combat mastitis.** Babson Bros, Naperville. 150p., 1991.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. **Efeito de extrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

PIOTROWSKA-TOMALA, K.K.; SIEMIENIUCH, M.J.; SZÓSTEK, A.Z.; KORZEKWA, A.J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; GALVÃO, A.M.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D.J. **Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland epithelial cells.** Journal Domestic Animal Endocrinology, vol. 43, n.4, p. 278-288, 2012.

POPOVA, M, BANKOVA VS, BUTOVSKA D, PETKOV V, NIKOLOVA-DAMYANOVA B., SABATINI A.G., MARCAZZAN G.L., BOGDANOV S. **Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar type propolis,** Phytochemical Analysis, vol. 15, p. 235-240, 2004.

POPOVA, M. P.; CHINOUB, I. B.; MAREKOVA, I.N.; BANKOVA, V.S. **Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis.** Phytochemistry, vol.70, p. 1262–1271, 2009.

RABOT, A.; WELLNITZ, O.; MEYER, H. H.D.; BRUCKMAIER, R. M. **Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue.** Journal of Dairy Research vol. 74 p.93–99. 2006.

RAINARD, P.; & RIOLLET, C. **Innate immunity of the bovine mammary gland.** Veterinary Research, vol. 37, p.369–400, 2006.

RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. **Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications.** Cell Biology and Toxicology, London, v. 27, n. 4, p. 267-284, 2011.

RENNISON, M.E.; KERR, M.; ADDEY, C.V.P.; HANDEL, S.E., TURNER, M.D.; WILDE, C.J.; BURGOYNE, R.D. **Inhibition of constitutive protein secretion from lactating mammary epithelial cells by FIL(feedback inhibitor of lactation), a secreted milk protein.** Journal of Cell Science, vol. 106, p. 641–648, 1993.

ROBERT, A.; SEEGER, H.; BAREILLE, N. **Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows--a quantitative analysis of published data.** Veterinary Research, vol. 37, n.1, p. 25-48, 2006.

ROSE, M.T.; ASO, H.; YONEKURA, S.; KOMATSU, T.; HAGINO, A.; OZUTSUMI, K.; OBARA, Y. **In vitro differentiation of a cloned bovine mammary epithelial cell.** Journal of Dairy Research, vol. 69, p. 345–355, 2002.

ROSEMBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, p.306, 1993.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. **Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds.** Journal of Clinical Microbiology, vol.42, p.3449-3455, 2004.

SALATINO, A. **Origin and chemical variation of Brazilian propolis.** Evidence Based Complementary Alternative Medicine. vol. 2, p.33-38, 2005.



SANTANA, H. F.; BARBOSA, A. A. T.; FERREIRA, S. O.; MANTOVANI, H. C. **Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 28, p. 485-491, 2012.

SATO, Y.; SUZAKI, S.; NISTIKAWA, T.; KIHARA, M.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T. **Phytochemical flavones isolates from *Scutellaria barbato* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 72, n.3, p. 483-488, 2000.

SAYED, S.M.; ABOU EL-ELLA, G. A.; WAHBA, N.; EL NISR, N. A.; RADDAD, K. ; EL RAHMAN, M.F. EL HAFEEZ, A.; EL FATTAH AAMER, A. A.; **Immune Defense of Rats Immunized with Fennel Honey, Propolis, and Bee Venom Against Induced Staphylococcal Infection.** Journal of Medicinal Food, vol. 12, n 3, p. 569-5975, 2009.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, J.R.A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 73, p. 243-249. 2000.

SFORCIN, J.M. **Propolis and the immune system: a review.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 113, p. 1-14, 2007.

SHAMAY, A., ZEELON, E., GHEZ, Z., COHEN, N., MACKINLAY, A.G., AND GERTLER, A. **Inhibition of casein and fat synthesis and  $\alpha$ -lactalbumin secretion by progesterone in explants from bovine lactating mammary glands.** Journal of Endocrinology, vol. 113, p. 81-88, 1987.

SHAMAY, A.; SHINDER, D.A.; BRUCKENTAL, I.; SILANIKOVO, N. **Inhibition of lactogenic activities of bovine mammary gland explants by the whey fraction of bovine milk.** Cell Biology International , vol. 21, n. 9, p. 601-604, 1997.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSURABA, Y.; KANAZAWA, K.; **Antioxidative bioavailability of artemisinin C in Brazilian propolis.** Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 424, p. 181-188, 2004.

SHIMIZU, T.; TAKESHITA, Y.; TAKAMORI, Y.; KAI, H.; SAWAMURA, R.; YOSHIDA, H.; WATANABE, W.; TSUTSUMI, A. ; PARK, Y. K.; YASUKAWA, K.; MATSUNO, K.; SHIRAKI, K.; KUROKAWA, M. **Efficacy of Brazilian Propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice and Their Modes of Antiherpetic Efficacies.** Evidences Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2011, p. 1-9, 2011.

SILICI, S., and KOC, A.N. **Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses.** Letter Applied Microbiology, vol. 4, p. 318-324. 2006.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. **Correlation analysis between phenolic levels of Brzilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities.** Food Chemistry, vol. 99, p. 431–435, 2006.

SILVA, N.R. **Aspectos do perfil e do conhecimento de apicultores sobre o manejo e sanidade da abelha africanizada em regiões de apicultura de Santa Catarina.** Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Jr. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology and Viticulture, vol.16, p. 144-158, 1965.

SOUSA, J.P.B., FURTADO, N.A.J.C., JORGE, R. SOARES, A.E.E., BASTOS, J. K. **Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M., FERREIRO, L. **Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras.** Ciência Rural , vol.39, n.1, p. 282-290, 2009.

SPEARS, J.W. & WEISS. W.P. **Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows.** The Veterinary Journal, vol. 176, p. 70–76, 2008.

SPEROTTO, V.R.; MURARI, A.L.; SILVA, D.A.R.; POSSENTI, C.G.R.; WIEST, J. M.; AVANCINI, C.A.M. **Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (macela) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina.** Acta Scientiae Veterinariae, vol. 40, p. 1052, 2012.

STRANDBERG, Y.; GRAY, C.; VUOCOLO, T.; DONALDSON, L.; BROADWAY, M.; TELLAM, R. **lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells.** Cytokine, vol. 31, p. 72–86, 2005.

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

TANI, H.; HASUMI, K.; TATEFUKI, T.; HASHIMOTO, K.; KOSHINO, H.; TAKAHASHI, S. **Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 18, p. 151–157, 2010.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.; MESSAGE, D.; SALANTINO, A. **Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry.** eCAM , Madri, v. 2, n.1, p. 85-92, 2005.

THIRUGNANASAMPANDAN, R. RAVEENDRAN, S. B.; JAYAKUMAR, R. **Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, vol. 2, p. 651-654, 2012.

TRONCARELLI, M.Z.; BRANDÃO, H. M.; GERN, J. C.; GUIMARAES, A. S.; LANGON, H. **Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos.** Veterinária e Zootecnia, vol. 20, p. 124-136, 2013.

TUCKER, H.A. **Hormones, mammary growth, and lactation: a 41 year perspective.** Journal of Dairy Science, vol. 70, p. 1958-1966, 2000.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULO, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.** Microbiology Research, vol. 160, p. 189-195, 2005.

VARGAS, A.C.; LOUGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis.** Ciência Rural, vol. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VELAZQUEZ, C.; NAVARRO, M.; ACOSTO, A.; ÂNGULO, A.; DOMINGUEZ, Z.; ROBLES, R.; ROBLES-ZEPEDA, R.; LUGO, E.; GAYCOOLEA, F.M.; VELAZQUEZ, E. F. **Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis.** Journal of Applied Microbiology, vol. 103, p. 1747-1756, 2007.

VIEIRA, T.S.W.J.; RIBEIRO, M.R.; NUNES, M.P.; MACHINSKI JÚNIOR, M.; PONTES NETTO, D. **Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil.** Semina: Ciências Agrárias, vol. 33, n. 2, p. 791-796, 2012.

WALLUM, E.; HEDANDER, J.; GABERG, P. **Research perspectives for prescreening alternatives to animal experimentation: On the relevance of cytotoxicity measurements, barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially hazardous compounds in large sets of chemicals.** Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 207, n. 2, p. 393-397, 2005.

WATTIAUX, M. A. **Princípios da ordenha.** In: Essências em gado de leite. University of Wisconsin-Madison: Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional, 140p., 2011.

WATTS, J.F. **Etiological agents of bovine mastitis.** Veterinary Microbiology, vol. 16, n. 1, p. 41-66, 1988.

WEI, W.; DEJIE, L.; XIAOJING, S.; TIANCHENG, W.; YONGGUO, C.; ZHENGTAO, T.; NAISHENG, Z. **Magnolol inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and mouse mastitis model.** *Inflammation*, 2014 August, 31. [Epub ahead of print].

WOLLENWEBER, E.; JAY, M. **Flavones and flavonols.** In: HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1980.**, London. Chapman and Hall, 1st ed, p. 233-302, 1988.

ZAFALON, L.F., NADER FILHO, A., OLIVEIRA, J.V., RESENDE, F.D. **Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação.** *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol.59, n.3, p.577-585, 2007.

ZEGGIO, A.R.S.; TOMAZZOLI, M.; OLIVEIRA, S.K.; ROCHA, M.; ZERI, A.C.M.; CARREIRA, R.; SFORCA, M.L.; MARASCHIN, M. **A 1H-NMR-Based Metabolic Analysis of Propolis from Santa Catarina State.** In: 16th World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, 2012 (a).

ZEGGIO, A.R.S.; TOMAZZOLI, M.; SILVA, D.A.; SOUZA, A.C.V.; MARASCHIN, M. **Classification of propolis produced in Santa Catarina state by UV-visible scanning spectrophotometry and principal component analysis.** In: 16th World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, 2012 (b).

ZIZIC, J. B.; VUKOVI, N.L.; JADRANIN, M.B.; ANDELKOVIC, B.D.; TESEVIC, V.V.; KACANIOVA, M. M. K.; SUKDOLAK, S. B.; MARKOVIC, S.D. **Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line.** *Journal of Science Food and Agriculture*, vol. 93, p. 3001-3009, 2013.