

MASTITE BOVINA POR *Staphylococcus aureus*: SENSIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIMICROBIANAS E AO EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS

[Bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*: susceptibility to antimicrobial drugs and the alcoholic extract of propolis]

Erika Kushikawa Sacki¹, Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto², Leopoldo Sussumu Matsumoto², Paulo Fernandes Marcusso³, Rachel Maciel Monteiro⁴

¹Bióloga, discente do Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL)

²Docente da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP/CLM)

³Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP/CLM)

⁴Acadêmico do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP/CLM)

RESUMO - A mastite é um dos fatores que mais gera prejuízos à produção e industrialização do leite. O objetivo deste trabalho foi isolar a espécie *Staphylococcus aureus* das amostras de leite provenientes de 63 animais portadores de mastite, e verificar o seu perfil de sensibilidade antimicrobiana aos antibióticos comerciais e ao extrato de própolis à 30%. Dos 63 animais avaliados, 38 (60,32%) apresentaram crescimento de *Staphylococcus aureus*. Quanto ao teste de sensibilidade antimicrobiana, os antibióticos mais eficientes foram gentamicina (10 µg), cefalexina (30 µg) e ciprofloxacina (10 µg) com 100% de eficácia, seguida de norfloxacina (94,6%). Houve 35 (92,10%) animais com sensibilidade ao extrato alcoólico de própolis a 30%, com diâmetros de inibição entre 6 e 18 mm frente a volumes de 40µL e 60 µL. A investigação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* para cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina é de grande importância antes da indicação do seu tratamento terapêutico. O uso do extrato alcoólico de própolis a 30% na terapia antimicrobiana pode ser uma alternativa, pois seus componentes conferem-lhe grande valor na medicina natural popular e preventiva.

Palavras-Chave: Antibiótico, mastite clínica, mastite subclínica, resistência.

ABSTRACT - Mastitis is one of the factors that cause damage to production and processing milk. The aim of this study was to isolate the species *Staphylococcus aureus* from milk samples from 63 animals with mastitis, and check your profile antimicrobial sensitivity to antibiotics and the extract of propolis at 30%. Of 63 animals evaluated, 38 (60.32%) showed growth of *Staphylococcus aureus*. As for testing of antimicrobial sensitivity test, the most efficient antibiotics were gentamicin (10 µg), cephalixin (30 µg) and ciprofloxacin (10 µg) with 100% efficiency, followed by norfloxacin (94.6%). There were 35 (92.10%) animals with sensitivity to the extract of propolis 30% with inhibition diameters between 6 and 18 mm in 40 µL and 60 µL. The investigation of *in vitro* antimicrobial susceptibility to *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis is extremely valuable to their treatment. The use of extract of propolis 30% in the antimicrobial therapy may be an alternative, because its components gives it excellent value in natural medicine and preventive.

Keywords: Antibiotic, clinical mastitis, subclinical mastitis, resistance.

INTRODUÇÃO

Na produção e industrialização do leite, um dos fatores que mais reduz a qualidade e a quantidade do produto é a mastite. Esta se caracteriza como um processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada como mastite clínica ou subclínica

(Andrade, 2010; Zanette et al., 2010; Oliveira et al., 2011).

Os patógenos responsáveis pela mastite bovina podem ser divididos em dois grupos de acordo com a sua origem e modo de transmissão: ambientais e contagiosos. Nas mastites ambientais os agentes infectantes se encontram normalmente no ambiente,

sendo os principais a *Escherichia coli*, o *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis* (Amorim et al., 2010; Martins et al., 2010).

As mastites contagiosas são classificadas assim, devido à sobrevivência dos microrganismos no interior da glândula mamária, excreção do agente infeccioso e à transmissão para outro animal. Dentre os patógenos contagiosos mais importantes estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* (Martins et al., 2010).

A espécie *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos de maior importância. Os principais reservatórios desta bactéria são os quartos mamários infectados, a pele do úbere e tetos (Fontana et al., 2010).

Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* é de grande preocupação pela produção de toxinas que contribuem para a patogênese da mastite. Além disso, esses microrganismos representam um problema de saúde pública, uma vez que mesmo pasteurizado, o leite pode apresentar contaminação por enterotoxinas termoestáveis, causando distúrbios alimentares no consumidor (Andrade, 2010; Drescher et al., 2010).

A terapia antimicrobiana é uma das principais ferramentas para o controle da mastite provocado por *Staphylococcus aureus*, e a aplicação de testes de susceptibilidade podem direcionar a escolha do melhor tratamento (Moroni et al., 2006).

O aumento de prevalência de *S. aureus* multi-resistentes causadores de mastite bovina é grave, principalmente devido à redução da efetividade dos antimicrobianos, aumento da morbidade, e dos custos para combater a doença. Além disso, o seu uso indiscriminado pode levar ao acúmulo de antibióticos nos alimentos, afetando a saúde humana (Pol & Ruegg, 2007).

Os resíduos de antibióticos no leite podem gerar fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, efeitos tóxicos e carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal (Freitas et al., 2005). Por isso, têm-se estimulado a busca por meios alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas.

Trabalhos recentes ilustram a diversidade biológica da própolis e, dentre elas, a atividade antibacteriana (Borges et al., 2009; Pinto et al., 2001); com ação mais eficiente contra bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas (Orsi et al., 2005). Tem sido descritos efeitos contra *Enterococcus* sp.,

Escherichia coli, e especialmente, *Staphylococcus aureus*.

O objetivo deste trabalho foi isolar a espécie *Staphylococcus aureus* das amostras de leite provenientes de animais portadores de mastite, e verificar o seu perfil de sensibilidade antimicrobiana aos antibióticos comerciais e ao extrato de própolis à 30%.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas 63 fêmeas bovinas da raça Holandesa e seus cruzamentos, provenientes de 2 propriedades localizadas nos municípios do estado de São Paulo, durante o período entre agosto de 2009 e março de 2010. Após o diagnóstico da mastite clínica e subclínica, pelo teste da caneca telada e pelo *California Mastitis Test* (CMT), respectivamente; as amostras de leite de cada quarto mamário, foram colhidas, imediatamente antes da ordenha, em frascos estéreis, com os devidos cuidados de higiene e antisepsia. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica, transportadas sob refrigeração de aproximadamente 4°C, e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná em Bandeirantes – PR, para posterior análise.

Isolamento de *Staphylococcus aureus*

As amostras foram semeadas em *Ágar Baird Parker*, enriquecido com gema de ovo com telurito de potássio, e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias caracterizadas como *Staphylococcus* spp. (colônias de cor negra, brilhantes, com zona de precipitação circundada por halo claro) foram submetidas à coloração de Gram e testes para a identificação da espécie *S. aureus* (prova da catalase, prova da coagulase e Reação da desoxirribonuclease em *Ágar DNase*), conforme Baird-Parker (1962) Pinto et al. (2001).

Avaliação da atividade antimicrobiana

A sensibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos foi determinada pela técnica de difusão em placas de *Ágar Mueller-Hinton*. As drogas utilizadas foram: ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), ciprofloxacina (10 µg), estreptomomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacina (10 µg) e tetraciclina (30 µg).

Para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato de própolis à 30%, utilizou-se a técnica em discos de papel filtro (Whatman número 1) com 7 mm de diâmetro que foram impregnados com alíquotas de 40 µL e 60 µL de extrato da própolis e 60 µL de álcool de cereais. Estes discos foram fixados sobre o meio de Ágar-ágar.

Paralelamente, prepararam-se, em tubos, 10 mL do meio BHI (infusão de cérebro e coração) semi-sólido, a 0,75%, adicionados com 1 mL da cultura bacteriana a ser testada previamente crescida por 18 horas a 37°C em BHI. O conteúdo destes tubos foi vertido sobre as placas para a obtenção de uma fina sobrecamada de meio. As placas, então, foram incubadas a 37°C por 24 horas. A inibição foi indicada pela presença de halo em volta do disco, onde não havia crescimento bacteriano visível (Pinto et al., 2001).

Preparo e Análise do extrato alcoólico de própolis (EAP) à 30%

A própolis utilizada foi proveniente da região de Marechal Cândido Rondon - PR, cuja flora apícola é composta principalmente pelas espécies: *Plathymenia foliosa*, *Hovenia dulcis*, *Parapiptadenia rígida*, *Mimosa binucronata* e *Cordia trichotoma* (Heinzen et al., 2009).

Coletou-se a própolis por raspagem, e posteriormente as amostras foram fragmentadas, pesadas e mantidas à temperatura de -4° C até o momento do preparo do extrato alcoólico conforme recomendado por Dantas et al. (2006). Para obtenção do extrato a 30% utilizou-se álcool de cereais, na proporção peso por peso, onde se pesou tanto a própolis quanto o solvente. Este extrato foi acondicionado em frasco âmbar, mantido ao abrigo da luz e durante 20 dias consecutivos de infusão, procedeu-se agitação diária, por trinta segundos, conforme Garcia et al. (2004). Ao término, obteve-se o extrato de própolis por meio de filtração, que foi encaminhado para análises físico-químicas no Laboratório de Apicultura do Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP - Campus de Botucatu. Determinou-se peso seco, extrato seco, compostos fenólicos (%), teor de Flavonóides em Quercetina (%), pH e propriedade antioxidante; de acordo com Orsi et al. (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana dos antibióticos comerciais

Foram analisadas 63 fêmeas, totalizando 246 quartos mamários, onde alguns se apresentaram afuncionais devido à mastite. Destes, 105 (42,68%) encontravam-se positivas para mastite na forma subclínica, a partir do *California Mastitis Test* (CMT) e quatro (1,63%) apresentaram mastite clínica. Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas et al. (2005), que ao analisar 246 animais (948 quartos mamários), 10 (1,0%) apresentaram mastite clínica e 562 (57,1%) mastite subclínica. Martins et al. (2010) verificou a presença de mastite clínica e subclínica em 5,8% e 65,0% dos quartos mamários, respectivamente. Diferentemente ocorreu em 2011 no estado do Pará, onde os autores analisaram 935 quartos mamários, e dentre estes, 6,6% apresentaram mastite subclínica, 1,3% mastite clínica e 92,1% foram negativos (Oliveira et al., 2011).

Estudos demonstram que a alta prevalência da mastite pode estar associada às más condições de higiene do ordenhador, bem como dos tetos e úberes das vacas antes, durante e após a ordenha (Oliveira et al., 2009).

Dos 63 animais avaliados, 38 (60,32%) apresentaram crescimento de *Staphylococcus aureus*. Este resultado apresenta-se condizente aos descritos na literatura. Zanette et al. (2010) observaram 70,9% de *S. aureus*. Ferreira et al. (2007) identificaram o gênero *Staphylococcus* sp. em 74,6% dos casos de mastite.

A alta frequência de *S. aureus* nos casos de mastite pode ser explicada pelo fato de que a pele do úbere e a dos tetos são os principais sítios de localização desses agentes, o que acaba facilitando as infecções por esse microrganismo (Zanette et al., 2010). Também pôde sugerir que, nos rebanhos avaliados, não estão sendo realizadas medidas eficientes de controle da mastite bovina.

O conhecimento dos padrões de sensibilidade e resistência aos diferentes antibióticos empregados no tratamento da mastite bovina causado por *Staphylococcus aureus*, é necessário e fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos que sejam efetivos, assim como para a construção de estratégias de tratamento (ARAÚJO, 1998).

Os agentes testados demonstraram sensibilidade acima de 50%. Os antibióticos mais eficientes foram gentamicina, cefalexina e ciprofloxacina com 100% de eficácia, seguida de norfloxacina (94,6%) (Figura 1).

Os dados se aproximam dos resultados de Araújo (1998); Andrade et al. (2010) e Fontana et al. (2010) que encontraram sensibilidade acima de 90% para gentamicina. Segundo Freitas et al. (2005), a gentamicina é um agente eficaz para o tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana.

Brito et al. (2001) e Freitas et al. (2005) observaram que a norfloxacina apresentou 100% e 96% de eficácia, respectivamente para *S. aureus*.

Os antimicrobianos menos eficazes foram tetraciclina e ampicilina com resistência de 10,82% e 13,51%, respectivamente. Fontana et al. (2010) verificou a resistência a ampicilina de 88,2% para *Staphylococcus* sp. Araújo (1998) apresentou 19,9% e 44,8% de cepas de *S. aureus* resistentes a tetraciclina e ampicilina, respectivamente. Kuchenbecker; Ribeiro; Cardoso (2009) encontraram resistência da tetraciclina em 16,7% de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados na rede oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, entre 2003 e 2004.

As cepas de *S. aureus* resistentes a diferentes grupos de antibióticos usados no combate da mastite bovina, muitas vezes estão relacionadas à má utilização de determinado produto, como, por exemplo, aplicação em subdosagens, período

insuficiente de tratamento dos animais (Araújo, 1998; Fontana et al., 2010).

Atividade antimicrobiana da própolis

O álcool de cereais não exerceu efeito inibidor sobre o crescimento de *S. aureus*. Este é utilizado como solvente na extração da própolis que foi avaliado quanto a uma possível capacidade bactericida e uma provável interferência do poder antimicrobiano do extrato de própolis.

Dos 38 animais que apresentaram crescimento de *Staphylococcus aureus*, 35 (92,10%) apresentaram sensibilidade ao extrato de própolis. Langoni (1996) obteve 90% de inibição ao *Streptococcus agalactiae* e 100% ao *Staphylococcus aureus*. Em 2006, a sensibilidade média ao extrato de própolis dos isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivos (94,4%) foi superior à dos isolados de *Streptococcus* sp. (85,2%) (Loguercio et al., 2006).

No presente estudo, houve formação de halos com diâmetros entre 6 e 18 mm para o extrato no volume de 40 µL e entre 6,5 a 18 mm em 60 µL (Tabela 1). Essas dimensões não foram muito diferentes das encontradas por outros autores. Pinto et al. (2001) em experimento semelhante encontraram halos de inibição de *S. aureus* com diâmetros que variaram 8,66 e 11,16 mm (média = 9,66 mm). Bankova et al. (1996) utilizando extrato produzido por etanol a 70%, encontraram halos de inibição cujos diâmetros variaram entre 6 e 10 mm; e Najmadeen & Kakamand (2009) halos entre 15 a 22 mm.

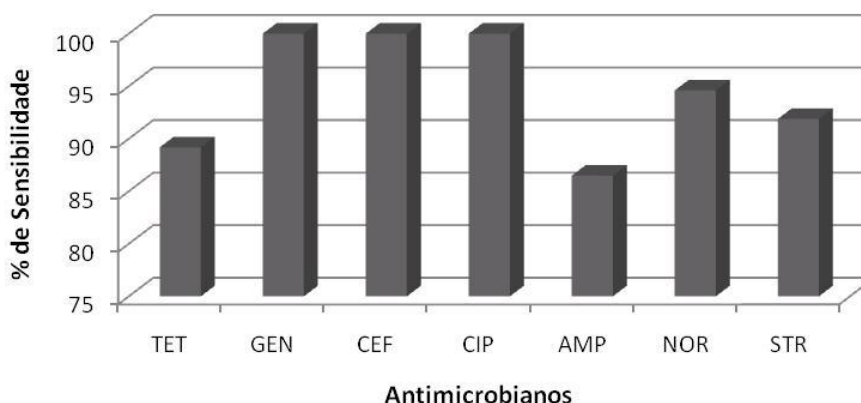


Figura 1. Percentual de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de mastite subclínica bovina. TET (tetraciclina); GEN (gentamicina); CEF (cefalexina); CIP (ciprofloxacina); AMP (ampicilina); NOR (norfloxacina) e STR (estreptomicina).

Tabela 1. Diâmetros médios, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, determinados pelos extratos de própolis e álcool de cereais.

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Própolis 40µL	8,73 mm
Própolis 60 µL	9,54 mm
Álcool de cereais	Ausente

A ação antimicrobiana da própolis para *Staphylococcus aureus* já havia sido sugerida por Endler et al. (2003); Pinto et al. (2001) e Auricchio et al. (2006). Esta ação se deve à presença de flavonóides, que são solubilizados em meio alcoólico, além de outros princípios ativos que sinergicamente contribuem para esta atividade (Auricchio et al., 2006). Segundo Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994), o extrato etanólico de própolis tem capacidade de prevenir a divisão celular, produzir defeitos na estrutura da parede celular, desorganizar o citoplasma; além de causar alteração na membrana citoplasmática e inibir a síntese protéica das bactérias.

Tem sido apresentado que a própolis tem acentuada ação inibitória *in vitro* sobre bactérias Gram-positivas. A diferença de sensibilidade entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas frente à própolis é devido às características da composição da parede celular entre os dois grupos de bactérias (Najmadeen & Kakamand, 2009).

Com relação à análise da própolis, determinou-se peso seco de 121,70 mg/mL e teor de extrato seco de 13,17%. A instrução normativa nº 03 (Brasil, 2001), estabelece apenas valores mínimos de extrato seco. Os valores aqui encontrados estão de acordo e acima do limite mínimo exigido para comercialização do produto.

Considerando-se que a composição química da própolis é extremamente complexa e que pode variar em até 300 componentes, e considerando-se ainda que os compostos fenólicos e flavonóides têm sido responsabilizados pelas principais atividades terapêuticas da própolis (Teixeira et al., 2006), optou-se por realizar especificamente essas determinações. Dessa forma, o presente estudo verificou teores de 55,5% e 1,19% de compostos fenólicos e flavonóides; respectivamente. O mínimo de compostos fenólicos exigido é 0,50% e 0,25% para os compostos flavonóides (Brasil, 2001). Dessa forma, pode-se observar que a amostra avaliada, enquadra-se nos padrões de qualidade.

Gonsales et al. (2006), verificaram variações entre 0,05 a 0,63% nos teores de flavonóides em extrato

etanólico de própolis a 70%, em São Paulo. Pavanelli et al. (2007), analisaram três tipos de extrato etanólico de própolis coletados em Campo Grande-MS, e encontraram valores médios de 40,15 % para compostos fenólicos e 3,16% para flavonóides.

Sousa et al. (2007) verificaram o teor de flavonóides totais em amostras provenientes do Estado de São Paulo (região de Franca) e Minas Gerais (região de Passo), encontrando valores de 0,38±0,06% para São Paulo e entre 0,12 a 2,11% para Minas Gerais.

Essa elevada variabilidade de compostos fenólicos na própolis deve-se provavelmente a diferentes fontes de exsudado vegetal, bem como a localização do apiário (Teixeira et al., 2006). Entretanto, apesar dessa variação, verificou-se que a própolis de diferentes regiões, mantiveram suas propriedades antibacteriana (Kujumgiev et al., 1999; Gonsales et al., 2006), antifúngica e antiviral, na maioria das amostras avaliadas (Kujumgiev et al., 1999).

Em relação ao pH, a amostra de própolis utilizada apresentou valor de 5,08 demonstrando a influência das substâncias extraídas (ação acidificante) sobre os líquidos extratores; o que também foi observado por Longhini et al. (2007) e Souza & Gonçalves (2008). A instrução normativa nº. 03 não estabelece um parâmetro de qualidade para essa variável (Brasil, 2001).

Substâncias flavonóides e compostos fenólicos, presentes nos extratos de própolis, são reconhecidos pela ação antioxidante (Souza & Gonçalves, 2008). Sousa et al. (2007) registraram essa atividade em amostras provenientes de São Paulo (região de Franca) e Minas Gerais (região de Passo). Corroborando com esses resultados, o presente estudo, verificou atividade antioxidante do EAP a 30% pela solubilidade positiva para acetato de chumbo e ao NaOH.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo ressaltam a importância da investigação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* para cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas

de mastite bovina antes da indicação do tratamento, para então reduzir perdas na produção de leite, além de impedir o aparecimento de cepas resistentes.

O uso do extrato alcoólico de própolis a 30% na terapia antimicrobiana pode ser uma alternativa, pois seus componentes conferem-lhe grande valor na medicina natural popular e preventiva. Seu efeito antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, demonstrou percentuais de atuação semelhantes (acima de 90%) aos de antimicrobianos comumente utilizados na terapia dessa enfermidade.

REFERÊNCIAS

- Amorim R.N.L., Souza A.O.G., Lima P.M., Bezerra F.N.B., Alves N.D. & Feijó F.M.C. 2010. Mastite clínica em bovino causada por *Prototheca zopfii* no estado do Ceará. Acta Vet. Brasilica. 4(4):307-311.
- Andrade, U.V.C. 2010. Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. 85p.
- Araújo W. P.1998. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 35(4):161-165.
- Auricchio M.T., Bugno A., Almodóvar A.A.B. & Pereira T.C. 2006. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 65(3):209-212.
- Baird-Parker A.C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J Appl Bacteriol. 25(1):12-19.
- Bankova V., Marcucci M. C., Simova S., Nikolova N.; Kujumgiev A. & Popov S. 1996. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. Zeit. fur Naturforschung. 51(5/6): 277-280.
- Borges C.H.F., Almeida D.A. & Fragiorge E.J. 2009. Atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes concentrações de extratos hidroalcoólicos de própolis em Lingüiça frescal suína. FAZU Rev. (6):53-82.
- BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 51 de 18 de setembro de 2001. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, Brasília, D. F. Secção 1, p.23-57.
- Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Silva M.A.S. & Carmo R.A. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(5):10-17.
- Dantas A.P., Salomão K. & Barbosa S.L.C. 2006. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101(2):207-211.
- Drescher G., Mattiello S.P., Peixoto R.M., Vargas A.C., Maciel M.N. & Costa M.M. 2010. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. Ciênc. Anim. Bras. 11(1):188-193.
- Endler A.L., Oliveira S.C., Amorim C.A., Carvalho M.P. & Pileggi M. 2003. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. Publ. Uepg ciências biológicas e da saúde. 9(2):17-20.
- Ferreira J. L., Lins J. L. H. A., Cavalcante T. V., Macedo N. A. & Borjas A. 2007. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. Ciênc. Anim. Bras. 8(2):261-266.
- Fontana V.L.D.S., Giannini M.J.S.M., Leite, C.Q.F., Miranda E.T., Almeida A.M.F., Fontana C.A.P., Souza C.M. & Stella A.E. 2010. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da β -lactamase em *Staphylococcus aureus*. Rev. Vet. Zoot. 17(4):552-559.
- Freitas M.F.L., Pinheiro Junior J.W., Stamford T.L.M., Rebelo A., Silva D.R., Silveira Filho V.M., Santos F.G.B., De Sena M.J. & Mota R.A. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. Arq. Inst. Biol. 72(2):171-177.
- Garcia R.C., Sá M.E.P., Langoni H. & Funari S.R.C. 2004. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* "in vitro". Acta Scientiarum, Animal Science 26(1):69-77.
- Gonsales G.Z., Orsi R.O., Fernandes Júnior A., Rodrigues P. & Funari S.R.C. 2006. Antibacterial activity of própolis collected in different regions of Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 12(2):276-284.
- Heinzen E.L., Lüpke C. J., Garcia R.C., Chambó E.D., Volk, S.M.B.S. & Chiréa A. 2009. Plantas apícolas e análise polínica de méis de *Apis mellifera*, na região oeste do Paraná. Anais IXX Congr. Bras. Zootec., 18-22 maio, Águas de Lindóia, SP.
- Kuchenbecker B. S., Ribeiro A. R. & Cardoso M. 2009. Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil. Acta Scientiae Vet. 37(2):143-149.
- Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R. & Popov S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol. 3(64)235-240.
- Langoni H., Domingues P.F., Funari S.R.C., Chande C.G. & Neves I.R. 1996. Efeito antimicrobiano "in vitro" da própolis. Arq. Bras. Vet. Zoot. 48:227-229.
- Longhini R., Raksa S.M., Oliveira A.C.P., Svidzinski, T.I.E. & Franco, S.L. 2007. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Rev. Bras. Farmacogn. 17(2):388-395.
- Loguercio A.P., Groff A.N.M., Pedrozo A.F., Witt N.M., Silva, M.S. & Vargas A.C. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. 2006. Pesq. agropec. bras., Brasília. 41(2):347-349.
- Martins R.P., Silva J.A.G., Nakazato L., Dutra V. & Almeida Filho E.S. 2010. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. Ciênc. Anim. Bras. 11(1):181-187.
- Moroni P., Pisoni G., Antonini M., Villa R., Boettcher P. & Carli S. 2006. Short Communication: Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus aureus* from Subclinical Bovine Mastitis in Italy. J. Dairy Sci. 89:2973-2976.

Najmadeen H.H. & Kakamand F.A.K. 2009. Antimicrobial activity of propolis collected in different regions of sulaimani province-Kurdistan region/Iraq. J. Duhok Univ. 12(1):233-239.

Oliveira A.A., Melo C.B. & Azevedo H.C. 2009. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. Ciênc. Anim. Bras. 10(1):226-230.

Oliveira C.M.C., Sousa M.G.S., Silva N.S., Mendonça C.L., Silveira J.A.S., Oaigen R.P., Andrade S.J.T & Barbosa J. D. 2011. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. Pesq. Vet. Bras. 31(2):104-110.

Orsi R.O., Sforcin J.M., Rall V.L.M., Funari S.R.C., Barbosa L. & Fernandes JR A. 2005. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 11(2):109-116.

Pavanelli D. M., Galindo Júnior J.B. & Bandeira M.C.E. 2007. Avaliação qualitativa de extratos de própolis do cerrado Sul Matogrossense. Anais 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP.

Pinto M.S., Faria J.E., Message D., Cassini S.T.A., Pereira C.S. & Gioso M.M. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38(6):278-283.

Pol M. & Ruegg P.L. 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. Journal of Dairy Science. 90:262-273.

Sousa J.P.B., Furtado N.A.J.C., Jorge R., Soares A.E.E. & Bastos J.K. 2007. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. Rev. Bras. Farmacogn. 17(1):85-93.

Souza J.A.M. & Gonçalves G.M.S. 2008. Avaliação da ação antioxidante de substâncias ativas cosméticas destinadas à prevenção da fotoenvelhecimento cutâneo. Anais XIII Encontro de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica, 21-22 out., Rio de Janeiro, RJ.

Takaisi-kikuni N.B. & Schilcher. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta Med. 60:222-227.

Teixeira E W., Message D., Negri G. & Salatino A. 2006. Bauer-7-en-3beta-yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. Quím. Nova. 29(2):245-246.

Zanette E., Scapin D. & Rossi E.M. 2010. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. Unoesc & Ciência – ACBS. 1(1):65-70.