

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PRÓPOLIS NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA  
BACTERIANA: UMA FERRAMENTA PARA A PRODUÇÃO  
DE LEITE ORGÂNICO**

**Gabriel Michelutti do Nascimento**

**Biomédico**

**2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PRÓPOLIS NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA  
BACTERIANA: UMA FERRAMENTA PARA A PRODUÇÃO  
DE LEITE ORGÂNICO**

**Gabriel Michelutti do Nascimento**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila**

**Coorientadora: Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,  
Campus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Microbiologia Agropecuária**

**2021**

## Ficha catalográfica

N244p	<p>Nascimento, Gabriel Michelutti do Própolis no controle da mastite bovina bacteriana: uma ferramenta para a produção de leite orgânico / Gabriel Michelutti do Nascimento. -- Jaboticabal, 2021 27 p. : tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Fernando Antônio de Ávila Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo</p> <p>1. Microbiologia veterinária. 2. Microbiologia dos laticínios. 3. Mastite. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## Certificado de aprovação

**unesp**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Jaboticabal**



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRÓPOLIS NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA BACTERIANA: UMA FERRAMENTA PARA A PRODUÇÃO DE LEITE ORGÂNICO

**AUTOR: GABRIEL MICHELUTTI DO NASCIMENTO**  
**ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA**  
**COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

φ/ Profa. Dra. NATÁLIA MARAMARQUE NESPOLO (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Sergipe (UFS) - Campus Sertão / Nossa Senhora da Glória/SE

φ/ Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 30 de novembro de 2021

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Gabriel Michelutti do Nascimento, filho de Maria de Fátima Michelutti do Nascimento e Ismael Bento do Nascimento, nascido na cidade de Jaboticabal – SP em 15 de abril de 1995, graduado em bacharelado em biomedicina pelo Centro Universitário Barão de Mauá em 2018. Trabalhou como técnico de laboratório no laboratório de densitometria óssea animal na faculdade UNESP Câmpus de Jaboticabal entre os anos de 2018 e 2019. Iniciou o programa de Mestrado em Microbiologia Agropecuária pela UNESP/FCAV no ano de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Número do Processo 88882.433645/2019-01.

Agradecemos também ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/FCAV, pela oportunidade e apoio na realização do presente trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Mastite bovina.....	02
2.2 Agentes bacterianos.....	03
2.2.1 <i>Staphylococcus</i> .....	04
2.2.2 <i>Streptococcus</i> .....	04
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	05
2.3 Produção de leite.....	06
2.3.1 Leite orgânico.....	07
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	07
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5. CONCLUSÃO.....	14
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

## PRÓPOLIS NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA BACTERIANA: UMA FERRAMENTA PARA A PRODUÇÃO DE LEITE ORGÂNICO

**RESUMO** – a mastite bovina é uma das principais causas de prejuízo econômico na indústria leiteira, portanto o controle e prevenção de microrganismos envolvidos nessa doença, principalmente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, é essencial. Uma das principais etapas na prevenção dessa doença é o uso de produtos antissépticos antes e depois do processo de ordenha, a fim de evitar contaminação bacteriana no úbere do animal. Atualmente, o produto antisséptico mais utilizado na indústria leiteira é a base de iodo, e fazendas produtoras de leite orgânico, que precisam seguir uma série de regulações estritas, incluindo o uso de produtos naturais sempre que possível, são frequentemente forçadas a adotar antissépticos não-naturais, como os a base de iodo por falta de alternativas naturais. Dentre as diversas substâncias naturais existentes há a substância própolis, um composto natural produzido por abelhas que tem sido extensivamente estudado por suas várias propriedades, sendo uma delas de ação antimicrobiana. Uma outra substância natural bem estudada é a citronela, possuindo propriedades repelentes quando aplicada em forma de óleo, auxiliando na prevenção de contaminações por vetores biológicos. Portanto, um novo produto antisséptico natural a base de própolis e citronela foi avaliado quanto sua capacidade de reduzir bactérias totais *in vivo* e prevenir o desenvolvimento de mastite bovina, além de poder ser utilizado na indústria leiteira orgânica. Para isso, um total de 128 amostras foram analisadas em termos de crescimento bacteriano para Enterobacteriaceae e *Staphylococcus* spp. utilizando a técnica de plaqueamento em superfície, a redução da concentração bacteriana após a aplicação dos produtos foi comparada entre as duas soluções antissépticas avaliadas, sendo uma solução a base de iodo servindo como controle e uma solução a base de própolis e citronela como a alternativa natural. Os resultados obtidos mostraram uma eficácia similar entre os produtos à base de iodo e própolis em termos de redução bacteriana total, indicando uma grande eficiência antibacteriana contra as bactérias mais comumente associadas com a mastite bovina. Realizou-se ainda a análise molecular para a identificação de *Streptococcus agalactiae*, mais frequentemente associado com casos subclínicos de mastite bovina. Todas as amostras avaliadas testaram negativo para a presença desse agente, indicando que os animais provavelmente não estavam acometidos pela doença. A capacidade do antisséptico natural em reduzir satisfatoriamente a concentração bacteriana total indica um importante achado para a indústria orgânica, apontando um novo produto de eficácia semelhante ao iodo, ao mesmo tempo em que mantém uma formulação natural para uso nesse tipo de produção.

**Palavras-chave:** Antisséptico, Citronela, Natural, Mastite, Microrganismos



## PROPOLIS IN THE CONTROL OF BACTERIAL BOVINE MASTITIS: A TOOL FOR THE PRODUCTION OF ORGANIC MILK

**ABSTRACT** – bovine mastitis is one of the main causes of economic damage in dairy farms, therefore the control and prevention of microorganisms involved in this disease, mainly *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, is essential. One of the most important steps for the prevention of the disease is the use of antiseptic products before and after the milking process, in order to avoid bacteria from infecting the udder of the animal. Currently, the most used antiseptic product in dairy farms is iodine-based, and organic dairy farms, which follow a number of strict regulations, including the use of natural products whenever possible, are often forced to adopt non-natural antiseptic products, such as iodine-based due to the lack of natural alternatives. Amongst the natural products available, there is the propolis, a natural compound produced by honeybees that has been extensively studied for its many properties, one of which is antimicrobial. Another well documented natural substance is citronella, possessing repellent properties when applied as an oil, aiding in the control of contamination via biological vectors. Therefore, a new natural propolis and citronella based antiseptic product was analyzed for its capacity in reducing bacteria *in vivo* in order to prevent the development of bovine mastitis, while being able to be utilized in organic dairy farms. A total of 128 samples were analyzed in terms of bacterial growth for *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus spp.* using the spread-plate technique, the reduction in the bacterial concentration after the application of the products was compared between two antiseptic solutions, an iodine-based solution as the control and a propolis-citronella based as the natural alternative. The results obtained showed a similar efficiency between the propolis and iodine products in terms of total bacterial reduction, indicating a great antimicrobial activity against bacteria most commonly associated with bovine mastitis. Molecular analysis was carried out for the identification of *Streptococcus agalactiae*, commonly associated with the subclinical form of bovine mastitis. All samples tested negative for the presence of this agent, suggesting that the animals were most likely not affected by the disease. The ability of the natural antiseptic in effectively reduce the total bacterial concentration indicates an important finding for the organic industry, pointing to a new product of similar efficiency to iodine, while maintaining a natural formulation for use in this type of production.

**Keywords:** Antiseptic, Citronella, Natural, Mastitis, Microorganisms

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria leiteira vem crescendo mundialmente, resultando em fazendas leiteiras constantemente buscando por novos produtos e métodos para aumentar a produtividade. Paralelamente a isso, há também uma grande demanda por produtos de origem orgânica, dentre eles o leite orgânico.

Cada país tem seu próprio conjunto de regras responsáveis pelo regimento da produção orgânica, no Brasil por exemplo, a organização federal responsável pelo regulamento da produção de leite orgânico é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, enquanto que a organização responsável pela fiscalização da produção é a Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA. De acordo com o MAPA (2011), fazendas produtoras de leite orgânico devem seguir uma série de regras específicas, como por exemplo a administração de antibióticos nos animais apenas em caso de doença, o não uso de suplementação hormonal, dar preferência por produtos de origem natural para a alimentação e limpeza dos animais sempre que possível, entre outros.

Garantir a qualidade e higiene do processo de ordenha é a etapa mais importante da produção, devendo ser devidamente realizada com a finalidade de evitar a contaminação do leite (RUEGG, 2017). O processo de higienização na ordenha envolve o uso de duas soluções antissépticas, a primeira é denominada *pré-dipping*, utilizada no teto do animal antes da instalação da ordenhadeira ou do processo de ordenha manual, enquanto que a segunda solução, chamada de *pós-dipping*, é aplicada no teto após o término da ordenha. Esse processo de higienização é importante não só para reduzir a concentração de microrganismos para níveis aceitáveis comercialmente (MAPA, 2018), mas também para prevenir a infecção do úbere por agentes patogênicos, reduzindo as chances do desenvolvimento de um quadro de mastite bovina.

A mastite bovina infecciosa é a inflamação do úbere causada por uma variedade de microrganismos (GOMES; HENRIQUES, 2016). No Brasil, essa doença é responsável por grandes prejuízos econômicos para as fazendas leiteiras (LOPES et al., 2012), onde os agentes bacterianos mais frequentemente isolados são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* (GAO et al., 2019; GOMES; HENRIQUES, 2016; HEIKKILÄ et al., 2018; MONISTERO et al., 2018),

reforçando a importância de uma boa higienização e cuidado com os animais, a fim de prevenir o desenvolvimento da doença e assegurar a produtividade e qualidade do leite.

Fazendas orgânicas possuem opções limitadas na escolha de soluções antissépticas para o processo de *dipping*, uma vez não existem produtos naturais para sua realização. Isso resulta no uso de produtos químicos destinados à produção convencional do leite, onde frequentemente soluções a base de iodo são utilizadas como padrão, resultando em um desalinhamento da ideologia orgânica e natural da produção orgânica, até que um produto natural seja introduzido no mercado.

Produtos à base de própolis são constantemente desenvolvidos para diversas aplicações baseadas em suas múltiplas propriedades, como por exemplo funções antioxidantes (GALEOTTI et al., 2018) e imunomoduladoras (BÚFALO et al., 2014). As propriedades antimicrobianas do própolis também são bem conhecidas (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019), indicando sua possível aplicação no setor animal através do desenvolvimento de produtos naturais, algo que seria especialmente importante no setor de produção de leite orgânico, agindo como uma alternativa no uso de agentes químicos convencionais.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia de uma nova solução antisséptica baseada em própolis e citronela na redução da concentração bacteriana no úbere de vacas leiteiras, diminuindo as chances do desenvolvimento da mastite bovina e ao mesmo tempo, servindo como uma opção natural para o uso na produção orgânica.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Mastite bovina**

A mastite é uma inflamação do úbere, um órgão contendo a glândula mamária responsável pela produção do leite. Vários fatores podem causar essa inflamação, sendo que traumas físicos e infecções são as causas mais comuns para o desenvolvimento da doença.

Traumas físicos no teto podem gerar danos ao esfíncter, um músculo presente no orifício do teto responsável pelo fechamento do canal mamário. Danos a esse

músculo podem interferir com sua capacidade de fechamento do canal, além de poder causar alterações na *teat lining*, uma barreira de defesa natural presente no úbere contendo compostos de ação bacteriostática como queratina e muco, com o objetivo de prevenir a penetração de agentes e a infecção da glândula mamária (ASHRAF; IMRAN, 2020).

No caso da mastite infecciosa, esta pode ser dividida em dois principais tipos: clínica e subclínica. A mastite clínica consiste na presença de sinais visíveis da infecção, como inchaço, vermelhidão e rigidez da área, acompanhados da redução no volume de leite produzido pelo animal afetado. Enquanto a mastite clínica pode ser relativamente fácil de identificar, a mastite subclínica só pode ser diagnosticada através de exames laboratoriais, uma vez que essa forma da doença não apresenta sinais visíveis de infecção (DE VLIEGHER et al., 2012).

Para que haja o desenvolvimento da mastite infecciosa, o agente necessita vencer os diversos mecanismos de defesa do sistema imunológico, como por exemplo o músculo esfíncter no orifício do teto, as camadas de queratina e muco que agem como barreira física, e também a roseta de Fürstenberg, uma região do úbere com alta concentração de leucócitos. Esses mecanismos fazem parte da resposta inata e são a primeira linha de defesa contra agentes patológicos (SORDILLO, 2018).

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento da mastite bovina, como a saúde do animal, higiene do local e também precauções durante a ordenha, seja manual ou automatizada. A mastite infecciosa é geralmente o tipo mais comum da doença, afetando fazendas leiteiras em todo o mundo e pode ser causada por uma variedade de agentes patológicos, como bactérias, leveduras e vírus (MOTAUNG et al., 2017). Portanto, a prevenção da doença é de extrema importância.

## **2.2 Agentes bacterianos**

No caso de mastite infecciosa bacteriana, a doença pode ser classificada em três tipos, de acordo com a sua incidência: mastite gram-positiva catalase-positiva (GPCP), causada principalmente por *Staphylococcus aureus*; mastite gram-positiva catalase-negativa (GPCN), causada principalmente por *S. agalactiae*, e mastite gram-

negativa ambiental, mais comumente causada por coliformes, em especial *Escherichia coli* (KLAAS; ZADOKS, 2018).

### **2.2.1 *Staphylococcus***

O gênero *Staphylococcus* consiste de cocos gram-positivos, não-esporulados, catalase-positivo. São bactérias presentes no meio ambiente e também fazem parte da microbiota normal de diversos animais, incluindo bovinos.

Dentro do gênero *Staphylococcus*, a espécie de maior importância médica é a bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável por causar diversas doenças nos mais variados hospedeiros (BALASUBRAMANIAN et al., 2017; HAAG; ROSS FITZGERALD; PENADÉS, 2019), além de possuir um alto grau de resistência a tratamentos. Estima-se que aproximadamente 50% dos casos de mastite infecciosa mundiais são causados por *S. aureus* e que destes casos, apenas cerca de 30% respondem ao tratamento com antibióticos (EL-SAYED; KAMEL, 2021).

Um outro estudo realizado em Bangladesh por Hoque et al. (2018) também indicou resultados semelhantes, mostrando a presença de mastite bovina em 50 das 175 amostras analisadas, das quais aproximadamente 74% eram causadas por *S. aureus*, com uma taxa de resistência à pelo menos um antibiótico acima de 79%.

Uma das principais severidades da mastite bovina causada por *S. aureus* é a alta capacidade de resistência dessa bactéria à antibióticos (LIU et al., 2020; VARELA-ORTIZ et al., 2018). Por conta disso, tratamentos alternativos estão sendo frequentemente explorados e estudados, como por exemplo o uso de nanopartículas para potencializar o efeito intracelular de antibióticos no tratamento contra essa bactéria (ALGHARIB; DAWOOD; XIE, 2020).

### **2.2.2 *Streptococcus***

*Streptococcus* é um gênero bacteriano caracterizado como cocos gram-positivos, não-esporulados, catalase-negativos e amplamente distribuído mundialmente. Este gênero possui diversas espécies de relevância médica, como *Streptococcus pyogenes* (IJAZ et al., 2020) e *Streptococcus pneumoniae* (ENGHOLM et al., 2017). Já tratando-se da mastite bovina, a espécie de maior importância é *Streptococcus agalactiae*, capaz de causar quadros de mastite contagiosa e

frequentemente associado com o tipo subclínico da doença, como evidenciado em diversos estudos (JØRGENSEN et al., 2016; ROSSI et al., 2019; TONG et al., 2019; ZHANG et al., 2018).

Outro estudo realizado na Etiópia por Lakew et al. (2019) evidenciou uma prevalência de 10% de *S. agalactiae* em casos de mastite subclínica. A alta prevalência desse agente em casos de mastite foi ainda evidenciada na Colômbia por Reyes et al. (2015), onde *S. agalactiae* foi encontrado em cerca de 27% das amostras analisadas.

Um dos principais problemas associados com *S. agalactiae* é a formação de biofilmes, sugerindo uma maior resistência aos tratamentos e contribuindo para a contaminação de equipamentos e de outros animais. Acredita-se que este seja uma das principais causas para a recorrência de mastite causada por esse agente (BONSAGLIA et al., 2020).

Além disso, grande parte dessas bactérias possui resistência à antibióticos, como mostrado em um estudo por Tian et al. (2019) onde 100% dos isolados de *Streptococcus* spp. possuíam resistência a mais de dois antibióticos, podendo chegar a 7 em alguns casos. Esses valores indicam um alto grau de multirresistência dessa bactéria, o que dificulta seu tratamento em quadros de mastite.

A maioria dos estudos científicos voltados para *S. agalactiae* também avaliam a presença de *Staphylococcus aureus*, pois ambos agentes são os mais frequentes causadores de mastite bovina do tipo infecciosa, subclasse contagiosa (CHENG; HAN, 2020).

### **2.2.3 *Escherichia coli***

A bactéria *Escherichia coli* pertence à família Enterobacteriaceae, classificada como bacilos gram-negativos, não-esporulados, catalase-positivo, oxidase-negativo e extremamente abundantes no meio ambiente. Diversas espécies de importância médica humana e animal se encontram nessa família bacteriana, como por exemplo *Yersinia pestis* (BARBIERI et al., 2021), *Klebsiella pneumoniae* (WANG et al., 2020), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (WOTZKA; NGUYEN; HARDT, 2017),

*Shigella sonnei* (SHAD; SHAD, 2021), *Serratia marcescens* (CRISTINA; SARTINI; SPAGNOLO, 2019) e a própria *Escherichia coli* (GOMES et al., 2016).

A mastite bovina causada por *E. coli* ocorre quando há a entrada dessa bactéria, que normalmente coloniza o trato gastrointestinal, dentro do canal mamário, frequentemente associada à contaminações ambientais por resquícios fecais. Essa bactéria é responsável pela maioria dos quadros de mastite infecciosa ambiental gram-negativa (ALAWNEH et al., 2020; FAHIM et al., 2019; LIU et al., 2018).

Um estudo realizado por Gao et al. (2017) também evidenciou *E. coli* como o agente bacteriano mais frequentemente isolado de mastite bovina clínica, identificado em 14,4% das amostras analisadas, sendo mais frequentemente isolado no período de verão.

Um dos principais problemas associado à contaminação por *E. coli* é a produção da endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) presente na estrutura celular de bactérias gram-negativas, podendo causar alterações gastrointestinais quando ingerida. Um estudo realizado por Townsend et al. (2007) demonstrou a presença de LPS em amostras de leite em pó, evidenciando a capacidade dessa endotoxina de sobreviver aos processos de industrialização do leite. Reforçando assim a importância de processos de higiene e salubridade durante a ordenha.

### **2.3 Produção de leite**

No Brasil, de acordo com um estudo realizado por Telles et al. (2020), a região sul do país é responsável pela maior produção do leite nacional, totalizando cerca de 34% da produção total brasileira. Porém as diferenças tecnológicas entre as microrregiões responsáveis pela produção de leite possuem um efeito heterogêneo na qualidade do produto final, implicando que é necessária uma melhor organização governamental para a padronização da qualidade do leite produzido.

Um estudo realizado nos Estados Unidos por Tunick & Van Hekken (2015) mostrou os diversos benefícios do consumo do leite. Sendo principalmente consumido por pessoas que realizam atividades físicas, mostrando que a proteína contida no leite possui valores de absorção extremamente altos pelo intestino (94%), além de possuir propriedades reguladoras da pressão arterial, cáries dentárias e até mesmo

anticancerígenas. Fazendo desse produto um excelente aliado para uma alimentação saudável e nutritiva.

### **2.3.1 Leite orgânico**

A produção de leite orgânico também tem ganhado popularidade mundial, sendo escolhida por muitos consumidores como uma opção mais saudável e menos industrializada. Sua principal diferença para a produção do leite convencional é a maneira pela qual o leite é adquirido, onde um conjunto de regras frequentemente mais rígidas é aplicado sobre produções orgânicas, com a finalidade de utilizar a menor quantidade possível de produtos químicos e substâncias que possuam a finalidade de aumento na produção do leite. Apesar dessas regras sofrerem variações consideráveis entre diferentes países, alguns itens são comuns para a produção orgânica mundial, como por exemplo a proibição do tratamento com antibióticos e da suplementação hormonal dos animais.

Um estudo realizado por Schwendel et al. (2015) mostra algumas das diferentes regras em alguns países referentes à produção orgânica, assim como a correlação entre diversos fatores que afetam a composição final do leite. Os autores chegaram à conclusão que o alto grau de heterogeneidade entre as produções de leite orgânico dificulta a avaliação adequada e padronizada da qualidade do produto final, diferentemente do cenário de produção do leite convencional.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este presente trabalho está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo número 2325/21.

### **Amostragem e Delineamento**

As amostras foram coletadas de vacas leiteiras da raça Girolando, entre os meses de agosto e outubro de 2019 em uma fazenda produtora de leite orgânico e certificada pela Nestlé, na cidade de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.



No total foram coletadas 128 amostras, divididas em 4 períodos de coleta (nomeados 1 a 4) com 32 amostras em cada período. Um total de 16 animais foram utilizados para obtenção das amostras, sendo subdivididos em 8 animais controle, onde a assepsia foi realizada utilizando o produto controle iodo-povidona, e 8 animais tratamento, onde a assepsia foi realizada com o produto natural a base de própolis 1% (92% teor alcoólico, produzido por Schraiber, Brasil) em 5 litros de solução hidroalcoólica 10% para o pré-*dipping*, já o pós-*dipping* foi composto de própolis 1% em 5 litros de solução glicerol. Houve a adição de óleo de citronela (produzido por Destilaria Bauru, Brasil) 0,2% (v/v) após a terceira coleta, agindo como uma substância natural de efeito repelente contra vetores biológicos. Todas as amostras foram provenientes dos mesmos animais, obtendo-se 16 amostras antes da aplicação do produto (pré-*dipping*) e 16 amostras após a aplicação (pós-*dipping*), resultando em 32 amostras por período de coleta.

Para avaliar a eficácia das soluções antissépticas, as amostras foram coletadas antes e depois da aplicação, como explicado previamente, isso permite a comparação entre a concentração bacteriana normalmente presente na pele dos animais, e a nova concentração após a aplicação dos produtos, permitindo a verificação da redução da carga bacteriana total por cada produto.

#### Coleta e análises microbiológicas

Para o procedimento de coleta foram utilizados *swabs* estéreis para a raspagem da pele ao redor do úbere dos animais em movimentos circulares, esse procedimento foi repetido três vezes para finalidade de padronização da coleta. Esses *swabs* então foram armazenados em tubos de ensaio contendo 4,5mL de água peptonada 0,1% (Kasvi, Brasil) e transportados para o laboratório de microbiologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/FCAV, para serem realizadas as análises microbiológicas e moleculares.

Foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-5}$  e as amostras foram inoculadas em placas de ágar Sal Manitol e MacConkey (Oxoid, Reino Unido) para a contagem de *Staphylococcus* sp e Enterobacteriaceae, respectivamente. Após a inoculação, as placas foram incubadas em 37°C por 24 – 48h, após esse período, foi feita a contagem

de unidades formadoras de colônia por cm<sup>2</sup> (UFC/cm<sup>2</sup>) seguindo o protocolo *Spread-Plate*.

Esse mesmo procedimento foi repetido para todos os períodos de coleta, permitindo uma comparação dos resultados de concentração bacteriana entre os produtos avaliados. Após o término da contagem, colônias isoladas foram transferidas para tubos Eppendorf contendo 500µL de caldo infuso cérebro-coração – BHI (Kasvi, Brasil) juntamente com 500µL de solução 30% glicerol e armazenados em *freezer* biológico a -80°C para futuras análises moleculares de identificação para *Streptococcus agalactiae*.

#### Extração de DNA e análise molecular

Para o processo de extração de DNA, as amostras foram descongeladas e inoculadas em novos tubos Eppendorf contendo 500µL de caldo BHI utilizando uma alça microbiológica estéril e incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação, o DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo de Kuramae modificado (2008). Onde 1mL da cultura bacteriana foi transferida para microtubos de 2mL e centrifugados a 13,400rpm a 10°C por 2 minutos, o sobrenadante resultante foi então descartado e o sedimento ressuspense em 700µL de buffer de extração, composto por 160mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM EDTA pH 8,0; 20mM NaCl e 0,5% (m/v) SDS, a suspensão foi então homogeneizada e incubada em banho maria a 65°C por 40 minutos.

Após a incubação, 300µL de acetato de potássio 5M foi adicionado ao tubo e a solução foi incubada a -20°C por 30 minutos. Após a retirada do freezer, adicionou-se 650µL de uma solução clorofórmio com álcool isoamílico (24:1 v/v), as amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 13,400rpm a 4°C por 10 minutos.

Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo vazio e adicionou-se 1mL de álcool absoluto, os tubos então foram homogeneizados e armazenados em *freezer* a -20°C por 18h. A etapa final da extração consistiu de uma última centrifugação a 13,400rpm a 10°C por 10 minutos, seguida do descarte do sobrenadante resultante e a secagem do sedimento em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a secagem, houve a ressuspensão do sedimento em 30µL de TE *buffer*, composto de 10mM Tris-HCl pH 8,0 e 1mM EDTA pH 8,0.

Para a análise molecular, optou-se pelo método de PCR utilizando a seguinte fórmula para o cálculo da solução *mix*, para uma amostra: 0,4µL DNTP (10mM); 2µL 10X solução *buffer* (100mM Tris-HCl, 500mM KCl e 0,8% Nonidet P40); 0,8µL MgCl<sub>2</sub> (25mM); 0,8µL *primer* (10pM); 0,2µL (1U) *Taq* DNA Polimerase (Fermentas Thermo Scientific, União Europeia) e 13,8µL de água ultrapura, elevando o volume final para 18µL. Os valores da fórmula foram multiplicados pelo número de amostras realizadas em cada reação de PCR.

O primer utilizado na reação de PCR para a identificação de *S. agalactiae* está descrito a seguir: SAGF (5'-TAGATGGCGAATTCAGTCTGAGA-3') e SAGR (5'-ATTGAGCAATCCCTATCACG-3'), com ciclos compostos por um primeiro estágio a 95°C por 2 minutos, seguido por 25 ciclos, cada um composto de uma fase de desnaturação a 94°C por 30 segundos, fase de anelamento em temperaturas específicas do primer por 45 segundos, e fase de extensão a 72°C por 45 segundos (CHIANG et al., 2008). A última etapa de extensão ocorreu a 72°C por 7 minutos. Ao término da reação de PCR, 5µL de *front dye* (0,25% azul de bromofenol em 50% glicerol) foram adicionados em cada amostra para permitir sua visualização em eletroforese.

Os produtos amplificados, juntamente com uma solução de DNA *ladder* de 100pb (Invitrogen, EUA) foram adicionados em gel de agarose a 1% (m/v) contendo brometo de etídio (1µg/mL) submerso em solução buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 10X. Os produtos foram então separados por eletroforese a 90V por 40 minutos, a leitura do gel foi realizada em transiluminador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System 170-8170, Bio-Rad Laboratories, EUA) sob luz ultravioleta e fotografada.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à contagem de UFC/cm<sup>2</sup>, o produto natural se mostrou eficiente, pois alcançou níveis de redução comparáveis com o produto controle, alcançando valores de 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup> para *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* spp. respectivamente após as aplicações. Essa redução comparável entre os produtos indica uma boa capacidade antisséptica da solução natural, reduzindo a concentração

bacteriana total para níveis aceitáveis na legislação brasileira em relação à produtos alimentares (ANVISA, 2019a, 2019b).

A média populacional bacteriana em UFC/cm<sup>2</sup> antes e após a aplicação dos produtos antissépticos está evidenciada na Tabela 1. Uma melhora na redução de *Staphylococcus* spp. foi observada na segunda formulação do produto natural em comparação com a primeira, como mostrado na Figura 1. Isso possivelmente se deve à adição do óleo de citronela, um composto natural com propriedades repelentes Kongkaew et al. (2011), possivelmente reduzindo a contaminação do úbere por vetores biológicos (Dieme et al., 2015), diminuindo a população bacteriana nas amostras.

A população de *Enterobacteriaceae* sofreu uma maior redução quando comparadas com *Staphylococcus* spp. em ambos os produtos, frequentemente sendo totalmente eliminada após a aplicação dos produtos. Este resultado contradiz os achados obtidos por Sforcin (2016), onde própolis mostrou maior atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, provavelmente por conta de componentes específicos de membrana e produção de enzimas hidrolíticas capazes de interagir negativamente com compostos presentes no própolis.

Possíveis explicações para essa diferença nos resultados podem incluir a sobrerregulação da bomba de efluxo celular após a aplicação dos produtos (JANG, 2016), esse mecanismo age como uma forma de resistência bacteriana, sendo responsável por diminuir a concentração de compostos intracelulares, diminuindo a eficiência dos produtos antissépticos, como evidenciado em alguns estudos referentes à diversas soluções antissépticas (EL SAYED ZAKI; BASTAWY; MONTASSER, 2019; HTUN et al., 2019; KAMPF, 2018).

Outra possível explicação seria a presença de genes de resistência, como evidenciado no estudo realizado por Ignak et al. (2017), onde uma alta prevalência de genes de resistência à diversos compostos antissépticos foi encontrada em estafilococos. Há também a possibilidade de um mecanismo de resistência devido a alterações em proteínas de membrana bacterianas, gerando resistência aos compostos antissépticos, como mostrado em um estudo realizado por Verspecht et al. (2019). Complementarmente, um estudo realizado por Foster (2017) mostrou um mecanismo de resistência à triclosan, um biocida que, semelhantemente ao própolis

e iodo, possui múltiplos alvos celulares, indicando que uma resistência semelhante pode ser possível para esses compostos.

Ambos os antissépticos utilizados no presente estudo possuem múltiplos mecanismos de ação (ALMUHAYAWI, 2020; MCDONNELL; DENVER RUSSELL, 1999). No caso do iodo-povidona (PVP-I), um complexo é formado através do halogênio iodo e o polímero sintético povidona, resultando na liberação de iodo livre após o contato com a célula bacteriana, o iodo então penetra a célula bacteriana para produzir diversos efeitos antimicrobianos, como oxidação de ácidos graxos, enzimas e nucleotídeos (BIGLIARDI et al., 2017).

Com relação à atividade antimicrobiana do própolis, isso ocorre graças a seus múltiplos componentes capazes de gerar tal atividade (ALMUHAYAWI, 2020), como flavonóides (PLAPER et al., 2003; TSAI et al., 2012; VELOZ; ALVEAR; SALAZAR, 2019), compostos fenólicos (VEIGA et al., 2017; YOSHIMASU et al., 2018), ácidos cinâmicos (GUZMAN, 2014; VASCONCELOS; CRODA; SIMIONATTO, 2018) e compostos imunomoduladores (ADACHI et al., 2019).

Outros fatores relacionados com a menor redução de *Staphylococcus* spp. podem incluir uma maior concentração inicial dessas bactérias nas amostras, representando uma concentração de cerca de 190% maior do que de *Enterobacteriaceae*. Além de fatores como tempo de contato e/ou concentração não ideais dos antissépticos para a ação antimicrobiana em gram-positivos, uma vez que as soluções antissépticas eram pré-formuladas pelo fabricante e o tempo de contato com a pele dos animais durante a aplicação poderia variar durante o processo de ordenha.

Uma maior expressão de mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida também pode ter influenciado para o resultado, reduzindo a difusão dos compostos antissépticos dentro da célula bacteriana (LABRECK et al., 2020). Finalmente, por conta dos períodos de coleta das amostras terem se estendido durante alguns meses, a variação do clima pode ter afetado a flora local, que por sua vez é responsável por possíveis alterações na composição e estrutura do própolis, alterando suas propriedades antimicrobianas (CASTRO et al., 2007; PINA et al., 2017).

Referente à identificação molecular de *S. agalactiae* através de PCR, todas as amostras testaram negativo para a presença desse agente, esse resultado está de

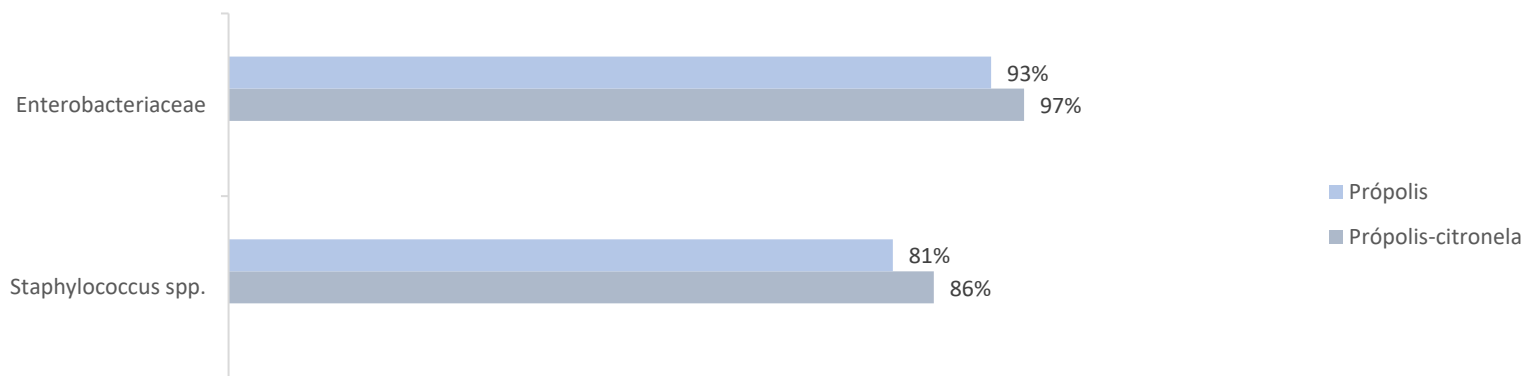
acordo com as condições observadas nos animais, que por sua vez não apresentaram redução no volume de leite produzido normalmente, indicando a ausência de mastite subclínica (ASHRAF; IMRAN, 2018; LAKEW; FAYERA; ALI, 2019). Além disso, a ausência de sinais visíveis de infecção sugere também que não havia a presença de quadros de mastite clínica, indicando que os animais avaliados durante o experimento estavam sadios.

Tabela 1: média populacional bacteriana (UFC/cm<sup>2</sup>) antes e após a aplicação dos produtos antissépticos

Produto utilizado e coleta (C)*	<i>Enterobacteriaceae</i> população pré- <i>dipping</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> população pós- <i>dipping</i>	<i>Staphylococcus</i> spp. população pré- <i>dipping</i>	<i>Staphylococcus</i> spp. população pós- <i>dipping</i>
Iodo-povidona C1	1.1x10 <sup>3</sup>	0	2.8x10 <sup>5</sup>	4.4x10 <sup>3</sup>
Própolis C1	4.2x10 <sup>2</sup>	0	7.2x10 <sup>4</sup>	5.9x10 <sup>3</sup>
Iodo-povidona C2	3.1x10 <sup>2</sup>	0	5.2x10 <sup>3</sup>	6.5x10 <sup>2</sup>
Própolis C2	1.4x10 <sup>3</sup>	2.3x10 <sup>2</sup>	1.8x10 <sup>4</sup>	6.6x10 <sup>3</sup>
Iodo-povidona C3	5.4x10 <sup>3</sup>	2.1x10 <sup>2</sup>	3.0x10 <sup>4</sup>	2.0x10 <sup>3</sup>
Própolis-citronela C3	1.2x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>	1.3x10 <sup>3</sup>
Iodo-povidona C4	1.2x10 <sup>3</sup>	2.0x10 <sup>2</sup>	1.6x10 <sup>4</sup>	2.9x10 <sup>3</sup>
Própolis-citronela C4	1.0x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>	3.8x10 <sup>4</sup>	7.0x10 <sup>3</sup>
Média populacional (UFC/cm <sup>2</sup> )				

Legenda: C\* = período da respectiva coleta, de C1 (primeira coleta) até C4 (quarta coleta).

Figura 1: média de redução bacteriana (%) entre ambas as formulações da solução antisséptica natural



## 5. CONCLUSÃO

O produto natural baseado em própolis e citronela apresentou uma ótima eficiência antisséptica no geral, possuindo resultados comparáveis com os produtos padrões à base de iodo. Esse achado é de grande importância para as fazendas leiteiras orgânicas, pois evidencia uma nova alternativa para o uso no processo de ordenha, mais alinhado com a ideologia orgânica e a legislação, servindo para impulsionar a produção de leite orgânico no Brasil.

Gostaríamos também de sugerir novos trabalhos na área utilizando própolis e citronela, pois por se tratarem de produtos naturais e complexos, são passíveis de diferentes graus de variação em sua composição e atividade, portanto a realização de novos estudos seria benéfica para o melhor entendimento e utilização na aplicação em produtos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, T. et al. Propolis induces Ca<sup>2+</sup> signaling in immune cells. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 38, n. 4, p. 141–149, 2019.
- ALAWNEH, J. I. et al. Survey and Sequence Characterization of Bovine Mastitis-Associated Escherichia coli in Dairy Herds. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. December, p. 1–16, 2020.
- ALGHARIB, S. A.; DAWOOD, A.; XIE, S. Nanoparticles for treatment of bovine Staphylococcus aureus mastitis. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 292–308, 2020.
- ALMUHAYAWI, M. S. Propolis as a novel antibacterial agent. **Saudi Journal of**

- Biological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 3079–3086, 2020.
- ANVISA. Diário oficial da união. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 dez. 2019**, v. 1, n. 249, p. 133, 2019a.
- ANVISA. Diário oficial da união. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2019**, v. 1, n. 249, p. 96, 2019b.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 6, p. 1193–1202, 2018.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, v. 21, n. 1, p. 36–49, 2020.
- BALASUBRAMANIAN, D. et al. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 1, p. 1–13, 2017.
- BARBIERI, R. et al. Yersinia pestis: The natural history of Plague. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 1, p. 1–44, 2021.
- BIGLIARDI, P. L. et al. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. **International Journal of Surgery**, v. 44, p. 260–268, 2017.
- BONSAGLIA, E. C. R. et al. Biofilm production under different atmospheres and growth media by Streptococcus agalactiae isolated from milk of cows with subclinical mastitis. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 1, p. 209–212, 2020.
- BÚFALO, M. C. et al. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 10, p. 1497–1504, 2014.
- CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.
- CHENG, W. N.; HAN, S. G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 11, p. 1699–1713, 2020.
- CHIANG, Y. C. et al. Use of primers based on the heat shock protein genes hsp70, hsp40, and hsp10, for the detection of bovine mastitis pathogens Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis and Streptococcus bovis. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 262–266, 2008.
- CRISTINA, M. L.; SARTINI, M.; SPAGNOLO, A. M. Serratia marcescens infections in neonatal intensive care units (NICUs). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 4, 2019.
- DE VliegHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025–1040, 2012.
- DIEME, C. et al. Transmission potential of rickettsia felis infection by Anopheles gambiae mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 26, p. 8088–8093, 2015.
- EL-SAYED, A.; KAMEL, M. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 2, 2021.
- EL SAYED ZAKI, M.; BASTAWY, S.; MONTASSER, K. Molecular study of resistance of Staphylococcus aureus to antiseptic quaternary ammonium compounds. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 17, p. 94–97, 2019.
- ENGHOLM, D. H. et al. A visual review of the human pathogen Streptococcus pneumoniae. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 854–879, 2017.



- FAHIM, K. M. et al. Isolation and characterization of *E. coli* strains causing intramammary infections from dairy animals and wild birds. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 61–70, 2019.
- FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430–449, 2017.
- GALEOTTI, F. et al. Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. **Foods**, v. 7, n. 3, 2018.
- GAO, J. et al. Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4797–4806, 2017.
- GAO, X. et al. Enterococcal isolates from bovine subclinical and clinical mastitis: Antimicrobial resistance and integron-gene cassette distribution. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, n. August 2018, p. 82–87, 2019.
- GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 377–382, 2016.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GUZMAN, J. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292–19349, 25 nov. 2014.
- HAAG, A. F.; ROSS FITZGERALD, J.; PENADÉS, J. R. *Staphylococcus aureus* in animals. **Gram-Positive Pathogens**, p. 731–746, 2019.
- HEIKKILÄ, A. M. et al. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9493–9504, 2018.
- HOQUE, M. N. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 53–60, 2018.
- HTUN, H. L. et al. Chlorhexidine and octenidine use, carriage of *qac* genes, and reduced antiseptic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a healthcare network. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 9, p. 1154.e1–1154.e7, 2019.
- IGNAK, S.; NAKIPOGLU, Y.; GURLER, B. Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 66–68, 2017.
- IJAZ, M. et al. Dissecting *Streptococcus pyogenes* interaction with human. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 8, p. 2023–2032, 2020.
- JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 2016.
- JØRGENSEN, H. J. et al. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds - rewriting the textbooks? **Veterinary Microbiology**, v. 184, p. 64–72, 2016.
- KAMPF, G. Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. e1–e22, 2018.
- KLAAS, I. C.; ZADOKS, R. N. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. April 2017, p. 166–185, 2018.
- KONGKAEW, C. et al. Effectiveness of citronella preparations in preventing mosquito bites: Systematic review of controlled laboratory experimental studies. **Tropical Medicine and International Health**, v. 16, n. 7, p. 802–810, 2011.
- KURAMAE, E. A RAPID, EASY AND HIGH YIELD PROTOCOL FOR TOTAL

- GENOMIC DNA ISOLATION OF *Colletotrichum gloeosporioides* AND *Fusarium oxysporum*. **Revista Universidade Estadual de Maringá**, v. 19, n. 3, p. 683–689, 2008.
- LABRECK, P. T. et al. Systematic Analysis of Efflux Pump-Mediated Antiseptic Resistance in *Staphylococcus aureus* Suggests a Need for Greater Antiseptic Stewardship. **mSphere**, v. 5, n. 1, 2020.
- LAKEW, B. T.; FAYERA, T.; ALI, Y. M. Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 6, p. 1507–1513, 2019.
- LIU, G. et al. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis exposed to subminimum inhibitory concentrations of cefalotin or ceftazidime. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- LIU, K. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates From Cases of Clinical Bovine Mastitis on Large-Scale Chinese Dairy Farms. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. December, p. 1–9, 2020.
- LOPES, M. A. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 477–483, 2012.
- MAPA. Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 out. 2011**, v. Seção 1, p. 4–12, 2011.
- MAPA. Instrução Normativa nº76, de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 nov. 2018**, v. Seção 1, p. 1–9, 2018.
- MCDONNELL, G.; DENVER RUSSELL, A. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.
- MONISTERO, V. et al. *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: Genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. **Toxins**, v. 10, n. 6, 2018.
- MOTAUNG, T. E. et al. Importance of bovine mastitis in Africa. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 58–69, 2017.
- PINA, R. et al. cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.
- PLAPER, A. et al. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, n. 2, p. 530–536, 2003.
- PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 11–13, 2019.
- REYES, J. et al. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5294–5303, 2015.
- ROSSI, R. S. et al. Efficacy of cefquinome and a combination of cloxacillin and ampicillin for treatment of dairy cows with *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–16, 2019.
- RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.
- SCHWENDEL, B. H. et al. Invited review: Organic and conventionally produced milk-

- An evaluation of factors influencing milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 721–746, 2015.
- SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894–905, 2016.
- SHAD, A. A.; SHAD, W. A. Shigella sonnei: virulence and antibiotic resistance. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 1, p. 45–58, 2021.
- SORDILLO, L. M. Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 507–523, 2018.
- TELLES, T. S. et al. Milk production systems in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, n. 1, p. 1–10, 2020.
- TIAN, X. Y. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of Streptococcus isolated from dairy cows with mastitis in China. **Microbial Pathogenesis**, v. 131, n. March, p. 33–39, 2019.
- TONG, J. et al. Microbiome and Metabolome Analyses of Milk From Dairy Cows With Subclinical Streptococcus agalactiae Mastitis—Potential Biomarkers. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. November, p. 1–14, 2019.
- TOWNSEND, S. et al. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and Enterobacter sakazakii on bacterial translocation in the infant rat. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 67–74, 2007.
- TSAI, Y. C. et al. Induction of oxidative DNA damage by flavonoids of propolis: Its mechanism and implication about antioxidant capacity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 191–196, 2012.
- TUNICK, M. H.; VAN HEKKEN, D. L. Dairy Products and Health: Recent Insights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 43, p. 9381–9388, 4 nov. 2015.
- VARELA-ORTIZ, D. F. et al. Antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. **Veterinary Research Communications**, v. 42, n. 3, p. 243–250, 2018.
- VASCONCELOS, N. G.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, n. March, p. 198–203, 2018.
- VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and Baccharis dracunculifolia DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911–920, 2017.
- VELOZ, J. J.; ALVEAR, M.; SALAZAR, L. A. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against Streptococcus mutans of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- VERSPECHT, T. et al. Development of antiseptic adaptation and cross-adaptation in selected oral pathogens in vitro. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- WANG, G. et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of klebsiella pneumoniae. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 1–17, 2020.
- WOTZKA, S. Y.; NGUYEN, B. D.; HARDT, W. D. Salmonella Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 4, p. 443–454, 2017.
- YOSHIMASU, Y. et al. Rapid Bactericidal Action of Propolis against Porphyromonas

gingivalis. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 8, p. 928–936, 2018.

ZHANG, H. et al. Transcriptomics and iTRAQ-Proteomics Analyses of Bovine Mammary Tissue with *Streptococcus agalactiae*-Induced Mastitis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 42, p. 11188–11196, 2018.