

DÉBORA TIEKO PARLATO SAKIYAMA

**Avaliação dos medicamentos homeopáticos *Sulphur* 30CH e *Calcarea carbonica* 30CH
para tratamento de vacas com mastite subclínica**

São Paulo
2010

DÉBORA TIEKO PARLATO SAKIYAMA

**Avaliação dos medicamentos homeopáticos *Sulphur* 30CH e *Calcarea carbonica* 30CH
para tratamento de vacas com mastite subclínica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2328
FMVZ

Sakiyama, Débora Tieko Parlato
Avaliação dos medicamentos homeopáticos *Sulphur* 30CH e *Calcarea carbonica* 30CH para tratamento de vacas com mastite subclínica / Débora Tieko Parlato Sakiyama. -- 2010.
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Homeopatia veterinária. 2. Mastite subclínica. 3. CCS. 4. PMN.
5. *Corynebacterium bovis*. I. Título.

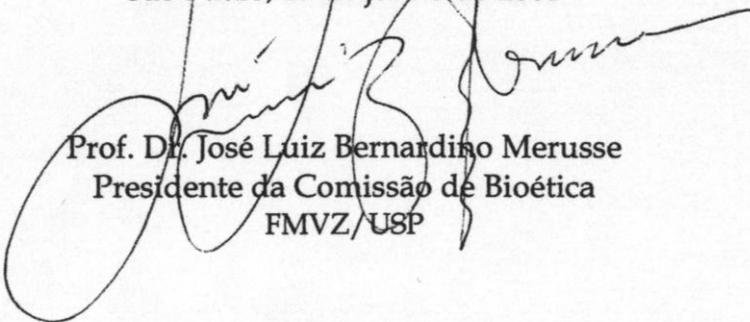


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do tratamento homeopático de vacas com mastite subclínica utilizando métodos indicadores da saúde da glândula mamária", protocolado sob o nº1374/2008, utilizando 30 (trinta) vacas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 18 de junho de 2008.

We certify that the Research "Evaluation of homeopathic treatment of dairy cows with subclinical mastitis applying indicator methods of mammary gland health", utilizing 30 (thirty) cows, protocol number 1374/2008, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/18/08.

São Paulo, 19 de junho de 2008


Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SAKIYAMA, Débora Tieko Parlato

Título: Avaliação dos medicamentos homeopáticos *Sulphur* 30CH e *Calcarea carbonica* 30CH para tratamento de vacas com mastite subclínica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Nanci e Mauro, que tanto admiro. E à minha filha, que já tanto amo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu irmão Bruno, meus avós, tios e primos. Enfim, à minha família tão amada; minha fortaleza.

Ao meu marido Tiago, pelo amor e companheirismo, e à sua família, pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, por me guiar no caminho da Homeopatia e me ensinar a praticá-la e por todos os outros ensinamentos durante a realização do meu mestrado.

À amiga querida Leslie Avila do Brasil Almeida, pelo exemplo de mulher e profissional e por ter compartilhado tantos momentos, sempre com sua força e alegria.

Ao Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste - CPPSE da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA por ter permitido a realização do experimento na Fazenda Canchim, São Carlos-SP.

Ao Dr. Luiz Francisco Zafalon pela orientação e colaboração, possibilitando a realização do trabalho na Fazenda Canchim do CPPSE da EMBRAPA.

Aos funcionários da Fazenda Canchim do CPPSE da EMBRAPA, Benedito Aparecido da Silva (Cidinho), José Cosme Machado, Aurélio Chagas Afonso, Leni Rosendo Pinto e Enilva Barbosa Machado, pela receptividade acolhedora e pela ajuda fundamental na execução do experimento a campo.

À Dra. Priscilla Anne Melville, técnica responsável pelo Laboratório de Bacteriologia e Micologia do VPS/FMVZ/USP, pela orientação e auxílio durante a realização dos exames microbiológicos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – VPS-FMVZ-USP, em especial, Danival Lopes Moreira, Ana Virgínia P. Almeida Prado, Maria Cristina Paick e Tânia Delonero, pela atenção.

Aos funcionários do Departamento de Pós-Graduação da FMVZ-USP e da Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice - FMVZ-USP, pela dedicação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos queridos Tatiana Reis do Rosário e Carlos Augusto Scacchetti Almeida, pelo prazeroso convívio e pela amizade que continuará sendo cultivada.

Aos colegas que conheci na pós-graduação e que de alguma forma participaram e me apoiaram durante a minha trajetória.

Aos meus queridos amigos que há anos estão presentes em minha vida, sempre compartilhando e iluminando meu caminho.

A Verdade (Bert Hellinger)

*A pura verdade nos parece clara
mas, como a lua cheia,
esconde um lado obscuro.
Porque brilha, ela ofusca.
Assim, quanto mais tentamos
agarrar ou fazer valer a face que nos mostra,
tanto mais inapreensível
sua face oculta
se furta secretamente
aos nossos conceitos.*

RESUMO

SAKIYAMA, D. T. P. **Avaliação dos medicamentos homeopáticos *Sulphur 30CH* e *Calcarea carbonica 30CH* para tratamento de vacas com mastite subclínica.** [Evaluation of homeopathic *Sulphur 30CH* and *Calcarea carbonica 30CH* for treatment of cows with subclinical mastitis.]. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O uso de antibióticos para tratamento da mastite bovina subclínica durante a lactação apresenta restrições econômicas e a administração indiscriminada e inadequada destes medicamentos os torna potencialmente tóxicos aos animais e aos consumidores finais dos produtos lácteos. A utilização de medicamentos homeopáticos oferece menor custo, facilidade de administração, não há risco de resistência microbiana e não é necessário o descarte do leite dos animais em tratamento. Além disso, a homeopatia é reconhecida no Brasil como especialidade médica veterinária e aceita para uso no sistema de produção animal orgânico. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de dois protocolos homeopáticos para tratamento da mastite bovina subclínica durante a lactação. O experimento foi realizado no período de seis meses e dividido em duas etapas. Na Etapa I, um grupo foi medicado com *Sulphur 30CH*, enquanto que o outro recebeu placebo. Na Etapa II, um grupo foi medicado com *Calcarea carbonica 30CH* e o outro grupo recebeu placebo. Os medicamentos foram administrados a cada trinta dias na Etapa I e a cada quinze dias na Etapa II. Em cada etapa foram coletadas amostras de leite antes, durante e após o tratamento. Para avaliar a eficácia dos protocolos, durante o experimento foram analisadas 138 amostras de leite na Etapa I e 72 amostras na Etapa II, realizando-se prova de Tamis, California Mastitis Test (CMT), contagem de células somáticas (CCS), quantificação de polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) por microscopia óptica, exame microbiológico e mensuração da produção leiteira. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o “software” Graphpad InStat 1990-93. Os protocolos homeopáticos testados não diminuíram a celularidade do leite, pois não houve diferenças significativas nos resultados do CMT e da CCS no decorrer do experimento. Também não foi constatada nenhuma alteração significativa na produção láctea. O microrganismo isolado com maior frequência no rebanho estudado foi o *Corynebacterium bovis*.

Porém, não houve diferenças significativas em relação à frequência de isolamento deste microrganismo ao longo dos tratamentos, indicando a sua permanência nas glândulas mamárias. Além disso, observou-se durante todo o experimento o predomínio de células PMN em relação às MN. Sugere-se o estudo de novos protocolos homeopáticos com outros medicamentos, potência e frequência de administração, a fim de buscar alternativas para o tratamento de vacas com mastite subclínica.

Palavras-chave: Homeopatia veterinária. Mastite subclínica. CCS. PMN. *Corynebacterium bovis*.

ABSTRACT

SAKIYAMA, D. T. P. **Evaluation of homeopathic *Sulphur 30CH* and *Calcarea carbonica 30CH* for treatment of cows with subclinical mastitis.** [Avaliação dos medicamentos homeopáticos *Sulphur 30CH* e *Calcarea carbonica 30CH* para tratamento de vacas com mastite subclínica.]. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The use of antibiotics for treatment of bovine subclinical mastitis during lactation presents economic restrictions and the indiscriminate and inappropriate administration of these drugs makes them potentially toxic to animals and consumers of dairy products. The use of homeopathic medicine offers lower cost, ease of administration, no risk of microbial resistance and is not necessary to discard milk from animals under treatment. Furthermore, homeopathy is recognized as a medical specialty in Brazil and support for veterinary use in organic livestock production system. Therefore, this study aimed to evaluate the effectiveness of two protocols for homeopathic treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. The experiment was performed between six months and divided into two stages. In Phase I, one group was treated with *Sulphur 30CH*, while the other received placebo. In Phase II, one group was treated with *Calcarea carbonica 30CH* and the other group received placebo. The drugs were administered every thirty days in the Phase I and every fifteen days in the Phase II. At each step the milk samples were collected before, during and after treatment. To evaluate the effectiveness of the protocols during the experiment were analyzed 138 samples of milk at Phase I and 72 samples at Phase II, performing proof Tamis, California Mastitis Test (CMT), somatic cell count (SCC), quantification of polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) by optical microscopy, microbiological examination and measurement of milk production. Statistical analysis was performed using the software Graphpad Instat 1990-93. The homeopathic protocols tested not diminished cellularity of milk because there were no significant differences in the results of CMT and SCC during the experiment. Nor was it found no significant change in milk production. The organism isolated most frequently in the herd studied was *Corynebacterium bovis*. However, no significant differences were observed in the frequency of isolation of this microorganism during the treatments, indicating his permanence in the mammary glands. Furthermore, it

was observed during the experiment a predominance of PMN cells compared to MN. It is suggested the study of new protocols with other homeopathic medicines, potency and frequency of administration, to find alternatives for the treatment of cows with subclinical mastitis.

Keywords: Veterinary homeopathy. Subclinical mastitis. SCC. PMN. *Corynebacterium bovis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 QUALIDADE DO LEITE E RISCOS À SAÚDE PÚBLICA.....	18
3.2 LEITE ORGÂNICO.....	19
3.3 MASTITE BOVINA: SAÚDE ANIMAL E CUSTOS ECONÔMICOS.....	22
3.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS).....	24
3.5 MASTITE BOVINA INFECCIOSA.....	25
3.5.1 Agentes etiológicos	26
3.6 SISTEMA DE DEFESA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	28
3.7 USO DA ALOPATIA PARA TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA.....	30
3.8 HOMEOPATIA.....	32
3.8.1 Homeopatia para Prevenção e Tratamento da Mastite Bovina	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	40
4.1.1 Exame Físico	41
4.1.2 Prova de Tamis	41
4.1.3 California Mastitis Test (CMT)	41
4.2 ETAPAS DO EXPERIMENTO.....	42
4.2.1 Etapa I	42
4.2.2 Etapa II	42
4.3 ESCOLHA DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO.....	43
4.3.1 Repertorização	43
4.3.1.1 Etapa I.....	44
4.3.1.2 Etapa II.....	45
4.3.2 Matéria Médica	46
4.3.2.1 Etapa I.....	46
4.3.2.2 Etapa II.....	46
4.3.3 Potência e frequência de administração do medicamento homeopático	47

4.3.3.1 Etapa I.....	47
4.3.3.2 Etapa II.....	47
4.3.4 Vias de administração do medicamento homeopático.....	47
4.3.5 Medicamento placebo.....	48
4.3.6 Aquisição e custo dos medicamentos.....	48
4.4 AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	48
4.4.1 Exame Físico.....	49
4.4.2 Teste de Tamis.....	49
4.4.3 CMT.....	49
4.4.4 CCS Eletrônica.....	49
4.4.5 CCS Óptica.....	50
4.4.6 Exame Microbiológico.....	51
4.4.7 Produção de Leite.....	51
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5 RESULTADOS.....	53
5.1 ETAPA I.....	53
5.1.1 Contagem de Células Somáticas.....	53
5.1.2 Produção Leiteira.....	54
5.1.3 Avaliação Microbiológica.....	54
5.2 ETAPA II.....	57
5.2.1 Contagem de Células Somáticas.....	57
5.2.2 Produção Leiteira.....	58
5.2.3 Avaliação Microbiológica.....	59
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A incidência de mastite continua sendo um desafio para a bovinocultura leiteira apesar dos avanços e melhorias nas áreas de tratamento e profilaxia. A mastite infecciosa é o tipo de mastite que mais acomete os rebanhos e que além de provocar um desequilíbrio no organismo do animal, acarreta prejuízos econômicos ao produtor devido às perdas de volume e de qualidade do leite produzido.

Associadamente às medidas de manejo profilático são frequentemente utilizados medicamentos alopáticos, principalmente antibióticos, para tratamento e prevenção da mastite. No entanto, o uso de antimicrobianos para tratar a mastite subclínica durante a lactação é considerado inviável economicamente e a taxa de cura bacteriológica nem sempre é satisfatória (COSTA, 2002).

Para reduzir os custos com a aquisição de medicamentos alopáticos e minimizar as perdas com o descarte de leite durante o período de carência recomendado pelos fabricantes, após o uso de antibióticos no tratamento da mastite de vacas em lactação, produtores buscam tratamentos alternativos ou complementares, como a homeopatia e a fitoterapia. No outro extremo da cadeia, é crescente a preocupação dos consumidores com a qualidade do leite não só em relação aos aspectos nutricionais e higiênicos, mas também quanto à presença de resíduos de antimicrobianos.

Além do risco à saúde pública ocasionado pela contaminação do leite com microrganismos patogênicos potencialmente zoonóticos como *Staphylococcus aureus* (CUNHA, 2007), *Escherichia coli* (SAÉNZ et al., 2001) e, mais raramente, *Corynebacterium bovis* (ACHERMANN et al., 2009), podem ocorrer problemas de saúde pública pelo risco tóxico da presença de resíduos de antibióticos no leite e pela veiculação de cepas bacterianas resistentes (STÖRH; WEGENER, 2000). Outro aspecto relevante é o impacto negativo ao meio ambiente causado pelos resíduos de antimicrobianos, que acabam afetando a saúde da população pela contaminação da água e do solo (SANDGREN; WALLER; EMANUELSON, 2008).

A busca por medicamentos menos tóxicos também vem sendo estimulada pelo crescimento do segmento da agricultura orgânica em âmbito nacional e internacional. As normas de produção orgânica apresentam variações em cada país, mas de modo geral é proibido ou não recomendado o uso de antibióticos para prevenção e tratamento de doenças em animais de produção. Segundo a legislação brasileira, os medicamentos

homeopáticos fazem parte da relação de substâncias permitidas para uso no sistema orgânico de produção (BRASIL, 2008).

No Brasil a homeopatia é reconhecida como especialidade médica veterinária (BENITES, 2005) e vem sendo utilizada na pecuária leiteira tanto sob a forma de complexos homeopáticos comerciais, quanto pela prescrição por médicos veterinários, devido às vantagens de menor custo, facilidade de administração ao rebanho, o descarte do leite durante o tratamento de vacas lactantes não é necessário e não há riscos de resistência microbiana, uma vez que os medicamentos homeopáticos atuam como estimulantes do sistema imunológico do animal e não agem diretamente contra o agente etiológico (BELLAVITE; ORTOLANI; CONFORTI, 2006).

Para melhor avaliar as terapias que vem sendo aplicadas a campo e garantir a saúde e o bem-estar animal, é importante a realização de pesquisas científicas acadêmicas com o objetivo de estudar os efeitos e a eficácia da homeopatia no tratamento da mastite bovina. Portanto, o presente trabalho avaliou dois diferentes protocolos homeopáticos, com base nos conceitos estabelecidos por Hahnemann (1995), para tratamento da mastite bovina subclínica durante a lactação.

2 OBJETIVO

Avaliar a eficácia dos medicamentos homeopáticos *Sulphur* 30CH e *Calcarea carbonica* 30CH, com baixa frequência de administração, para tratamento da mastite subclínica em vacas leiteiras durante a lactação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 QUALIDADE DO LEITE E RISCOS À SAÚDE PÚBLICA

A qualidade do leite e seus derivados abrangem vários aspectos como: ausência de substâncias estranhas (antibióticos, sujidades, etc), ausência de microrganismos patogênicos, sabor, odor e cor normais e evidências de condições higiênico-sanitárias eficientes na fazenda, transporte e processamento, indicadas por análises microbiológicas, quantidade adequada dos constituintes de importância nutricional e tecnológica e concentração normal de células somáticas (CERQUEIRA; SENA, 1998).

O leite pode veicular uma série de microrganismos patogênicos, bem como as toxinas de alguns deles, possibilitando a ocorrência de casos de infecções ou toxinfecções alimentares. Destacam-se como potencialmente zoonóticos: *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, determinados sorotipos de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, entre outros (LANGONI, 2007).

Além de ser um dos principais agentes da mastite contagiosa, isolado frequentemente nos rebanhos leiteiros, o *Staphylococcus aureus* representa riscos à saúde pública devido às cepas produtoras de enterotoxinas e toxina do choque tóxico. Enterotoxinas termoestáveis podem ser veiculadas pelo leite cru, pasteurizado ou subprodutos lácteos e ocasionar gastroenterite estafilocócica nos consumidores (SÁ et al., 2004; CUNHA, 2007).

Outro agente contagioso associado frequentemente à etiologia da mastite subclínica nos rebanhos bovinos leiteiros é o *Corynebacterium bovis*, descrito por muitos autores como um patógeno humano ocasional, ao qual não se deve dar muita importância no diagnóstico de doenças humanas (FUNKE et al., 1997; BERNARD et al., 2002). No entanto, apesar de rara, alguns autores já relataram a ocorrência de infecção humana por *C. bovis* e questionaram se a transmissão do patógeno ocorre pela ingestão de leite contaminado ou pelo contato direto com bovinos. Dulty et al. (2003) relataram um caso de conjuntivite purulenta por *C. bovis* em um menino de 14 meses que vivia próximo a uma fazenda de gado e Achermann et al. (2009) relataram o primeiro caso de infecção de joelho causada por *C. bovis* após cirurgia para implante de prótese em uma senhora de 62 anos que nunca havia tido contato direto com bovinos.

Além da presença de microrganismos patogênicos, outro fator prejudicial à qualidade do leite e que acarreta riscos à saúde dos consumidores é a presença de resíduos de antimicrobianos, medicamentos amplamente utilizados em sistemas de produção de leite convencionais, tanto para a prevenção, quanto para o tratamento de mastites clínicas e subclínicas, no período seco ou durante a lactação. A persistência de resíduos de antimicrobianos em período superior ao recomendado pela indústria farmacêutica para descarte do leite após o tratamento da mastite pode ser influenciada por vários fatores, como volume da produção de leite, intensidade da infecção, via de administração e grupo farmacológico utilizado (RAIA, 2006).

Além do risco tóxico que a presença de resíduos de antibióticos no leite pode ocasionar ao consumidor, o uso intensivo e muitas vezes indevido de antimicrobianos para tratamento de infecções intramamárias bovinas propicia o aumento da resistência bacteriana, dificultando a ação e a eficácia dos medicamentos (COSTA, 2002; RAIA, 2006).

É possível a transmissão ao homem de microrganismos resistentes de origem animal, inclusive com potencial zoonótico como, por exemplo, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, através dos alimentos ou até mesmo pelo contato direto com os animais (SAÉNZ et al., 2001). A resistência bacteriana sugere a presença de fatores de virulência que podem ser transmitidos para microrganismos da mesma espécie, favorecendo a disseminação de cepas resistentes e interferindo na terapia antimicrobiana. Trata-se de um sério e emergente problema de saúde pública, principalmente porque muitos antimicrobianos licenciados para a medicina humana também são registrados e utilizados na medicina veterinária (STÖRH; WEGENER, 2000; SAÉNZ et al., 2001; GARINO JR.; COSTA, 2003).

3.2 LEITE ORGÂNICO

Uma opção de leite mais saudável já disponível no mercado brasileiro é o leite orgânico produzido em propriedades certificadas que obedecem às normas de produção orgânica estabelecidas pela legislação brasileira e que a partir de 31 de dezembro de 2010 terão que ser certificadas por um Organismo de Avaliação da Conformidade Orgânica credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Esse Sistema tem como objetivo monitorar as propriedades e órgãos certificadores e garantir ao consumidor que todo produto orgânico de origem nacional seja oriundo de um sistema orgânico de produção agropecuária em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003; BRASIL, 2007).

Além das normas gerais, que se aplicam a todos os sistemas de produção agropecuária, há também instruções específicas como as estabelecidas pela Instrução Normativa 64 do MAPA, que aprova o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal. Nesse regulamento estão relacionadas somente as substâncias permitidas para prevenção e tratamento das enfermidades dos animais (Quadro 1) e os medicamentos homeopáticos estão incluídos dessa lista. Apenas no caso de doenças ou ferimentos em que o uso das substâncias permitidas não esteja surtindo efeito e que, por conta disso, o animal esteja sofrendo, os produtores deverão tratá-los com produtos que impliquem a perda da categoria de produto orgânico, e o período de carência a ser respeitado para que os produtos dos animais tratados possam voltar a ser reconhecidos como orgânicos deverá ser duas vezes o período de carência estipulado na bula do produto. Durante o tratamento e durante o período de carência, o animal deverá ser identificado e alojado em ambiente isolado, sendo que ele e seus produtos não poderão ser vendidos como orgânicos. Cada animal poderá ser tratado com medicamentos não permitidos para uso na produção orgânica por no máximo duas vezes no período de um ano, com intervalo mínimo de três meses entre cada tratamento e no máximo três vezes em toda a sua vida. Se houver necessidade de aumentar a frequência dos tratamentos estipulada, o animal deverá ser retirado do sistema orgânico (BRASIL, 2008).

Substâncias
Enzimas
Vitaminas
Aminoácidos
Própolis
Microrganismos
Preparados Homeopáticos
Fitoterápicos
Extratos Vegetais
Minerais
Veículos (proibidos os sintéticos)
Sabões e detergentes neutros e biodegradáveis

Quadro 1-Relação de substâncias permitidas na prevenção e tratamento de enfermidades dos animais orgânicos-Brasil-2008

De acordo com as estatísticas da International Federation Organic Agriculture Movement, IFOAM, e o Research Institute of Organic Agriculture, FIBL, existem 35 milhões de hectares de terra no mundo, distribuídos em 154 países, ocupados com produção orgânica certificada (WILLER, 2010) e o mercado global de produtos orgânicos cresceu 235% entre 1999 e 2010, com uma média de 21% ao ano (SAHOTA, 2010). No Brasil, os estabelecimentos agropecuários produtores de orgânicos representam aproximadamente 1,8% do total investigado no Censo Agropecuário de 2006, e do total de 2.277.211 de estabelecimentos de pecuária e criação de outros animais, os estabelecimentos orgânicos com o mesmo tipo de atividade representam apenas 1,67% (38.014), sendo que destes somente 1.850 são certificados (IBGE, 2006).

A produção de leite orgânico no Brasil ainda é insipiente, não chegando a 0,1% de nossa produção, que é de aproximadamente 25 milhões de litros por ano. Diversos fatores contribuem para essa pequena participação nos índices de produção, como a deficiência na legislação, que caracterizou oficialmente a produção orgânica apenas em 2003, poucos trabalhos de extensão rural viabilizando o processo para pequenos produtores e até a carência de pesquisas científicas adequando o manejo alimentar e sanitário dos animais de produção orgânica à realidade tropical (ALVES, 2005).

Contudo, há alguns anos, pesquisas com o leite orgânico produzido no Brasil já vem sendo realizadas com o objetivo de investigar seus aspectos nutricionais, microbiológicos, citológicos e também se estão sendo respeitados os parâmetros de qualidade do leite estabelecidos pela Instrução Normativa 51 do MAPA e a legislação de

produção orgânica (CAMPOS, 2004; FANTI et al., 2008; LANGONI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009).

3.3 MASTITE BOVINA: SAÚDE ANIMAL E CUSTOS ECONÔMICOS

A ocorrência da mastite, inflamação da glândula mamária, está relacionada ao desequilíbrio entre a resistência da vaca, o agente patogênico e o ambiente. A resistência do animal tem impacto direto sobre o desenvolvimento da mastite e, além da imunidade, abrange características anatômicas dos tetos e úbere, estágio de lactação, número de partos e adequação nutricional (SANTOS; FONSECA, 2007).

Dentre os fatores de risco ambientais associados à ocorrência de mastite estão manejo inadequado, inexistência de treinamento dos ordenhadores, não utilização de serviços laboratoriais para identificação dos patógenos e uso de equipamentos de ordenha sem manutenção periódica (COENTRÃO et al., 2008).

Portanto, a mastite não deve ser vista apenas como uma infecção na glândula mamária causada apenas por um patógeno, mas sim como a expressão de um conjunto de condições inadequadas presentes no sistema de produção (MITIEDRO, 2002), ou melhor, no organismo agrícola (STEINER, 1998).

Em relação ao status sanitário do rebanho bovino a mastite constitui um dos fatores que mais compromete a qualidade do leite. Trata-se de uma patologia de alta complexidade, caracterizada por um processo inflamatório decorrente de alterações fisiológicas e/ou metabólicas, traumas, alergias, ou da ação de microrganismos (BLOOD; RADOSTITS, 1991; COSTA, 2002). Este processo prejudica a produção leiteira tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo, sendo capaz de promover alterações de natureza física, química e bacteriológica do leite e derivados lácteos, presença de antimicrobianos nos mesmos e alterações patológicas teciduais na glândula mamária (BLOOD; RADOSTITS, 1991; COSTA et al., 1999).

As mastites são classificadas em clínica e subclínica dependendo da intensidade do processo inflamatório e comprometimento do parênquima mamário. A mastite clínica é caracterizada por leite anormal e inchaço ou dor na glândula mamária, podendo ser acompanhada por sinais sistêmicos como elevação da temperatura retal, letargia ou anorexia. Além do declínio da produção láctea, há a presença de bactérias no leite,

aumento importante da contagem de células somáticas (CCS) e significativas alterações na composição (HARMON, 1994). O diagnóstico da mastite clínica é feito a partir da inspeção e palpação minuciosas da glândula mamária e da análise dos primeiros jatos de leite utilizando-se a Prova de Tamis para verificar a presença de grumos, coágulos de pus, sangue ou leite aguado (LANGONI, 2007).

Infecções subclínicas são aquelas que não causam alterações visíveis na aparência do leite ou do úbere, mas a produção de leite diminui, a CCS sofre elevação de moderada a alta dependendo das bactérias envolvidas no processo inflamatório e a composição do leite pode apresentar alterações no teor de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, conteúdo de caseína e outras características físico-químicas (HARMON, 1994; ZAFALON et al., 2005). O diagnóstico de mastite subclínica é obtido pela detecção indireta de células somáticas por meio do California Mastitis Test (CMT) e de forma direta pela contagem de células somáticas por aparelhos eletrônicos ou por microscopia óptica (SANTOS; FONSECA 2007). Além disso, a realização do exame microbiológico a partir de lactoculturas indica o agente infeccioso responsável (LANGONI, 2007).

Estima-se que para cada vaca com mastite clínica existam até nove, ou mais, com mastite subclínica, sendo esta última a causa dos maiores prejuízos para a pecuária leiteira devido à diminuição da produção de leite que acarreta (BLOOD; RADOSTITS, 1991; COSTA, 2002).

Em trabalho realizado em 78 propriedades de bovinocultura leiteira na Holanda, o cálculo da perda econômica total causada pela mastite subclínica variou de € 53 a € 120 por vaca, por ano, dependendo da contagem de células somáticas do leite do tanque. Constatou-se também que a maioria dos produtores (72%) considerava que suas perdas econômicas fossem menores do que as obtidas pelos cálculos propostos (HUIJPS; LAM; HOGEVEEN, 2008).

Em estudo realizado no Brasil, avaliando os prejuízos acarretados pela mastite subclínica, estimou-se que o custo da prevenção de mastite foi em média de US\$ 23,98 por vaca, por ano, e as perdas por mastite subclínica foram, em média, de US\$ 317,38 por vaca, por ano (COSTA et al., 1999).

Para calcular de forma mais precisa os prejuízos econômicos causados pela mastite devem ser considerados fatores específicos a cada propriedade, incluindo perdas da produção de leite, incidência de mastite clínica e subclínica, patógenos envolvidos,

fármacos utilizados, descarte de leite, serviços veterinários, abate de animais e custos com mão-de-obra (HUIJPS; LAM; HOGVEEN, 2008).

3.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)

As células presentes no leite são denominadas células somáticas, sendo representadas por leucócitos (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos). Também há presença de pequena porcentagem de diferentes tipos de células epiteliais da glândula mamária, derivadas dos ductos e alvéolos. A quantidade e os tipos de células presentes no leite são o reflexo do estado de saúde da glândula mamária e estão relacionados com diversos fatores como estágio da lactação, intensidade da mastite e atividade secretora de leite. Durante a inflamação o maior aumento da CCS deve-se ao influxo de células polimorfonucleares (PMN) no leite (DOHOO; MEEK, 1982; HARMON, 1994).

Muitos fatores podem afetar a CCS do leite, como a idade, o estágio de lactação, o estresse, a nutrição e as mudanças de estações, devido à relação entre determinadas condições climáticas e suscetibilidade dos animais a infecções, mas a mastite é o fator mais preocupante e o estágio, grau da infecção e o tipo de microrganismo envolvido podem provocar diferentes variações na produção das células somáticas (HARMON, 1994; MAGALHÃES et al., 2006).

O leite de uma glândula mamária normal, não infectada, contém macrófagos, neutrófilos e linfócitos, não ultrapassando 250.000 células/ml de leite. Quando há o processo inflamatório e, conseqüentemente, o aumento de PMN, a quantidade de células aumenta, podendo ultrapassar 5.000.000 células/ml de leite em casos de mastite clínica (COSTA, 2002).

Para padronizar os parâmetros de avaliação da qualidade do leite, a Instrução Normativa 51 estabelece o limite de 750.000 células/ml do leite para consumo nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, entre os anos de 2008 a 2011. A partir de julho de 2011, o limite estabelecido é de 400.000 células/ml (BRASIL, 2002).

Portanto, a quantificação de células somáticas é uma ferramenta importante para detecção e monitoramento da ocorrência de mastite, principalmente subclínica, em uma propriedade leiteira, permitindo a padronização da qualidade do leite. Os testes mais confiáveis e comumente utilizados para contagem de células somáticas e diagnóstico da

mastite nos rebanhos bovinos são o CMT, teste de detecção indireta, e a CCS eletrônica, método de contagem direta realizado por laboratórios credenciados pelo MAPA (SANTOS; FONSECA, 2007; DELLA LIBERA et al., 2009). O CMT é de fácil aplicação e um bom teste para estimativa do nível de células somáticas a campo, sendo recomendado seu uso como teste de triagem. Para análise de um grande número de amostras, com rapidez e maior precisão de resultados recomenda-se o método eletrônico de CCS (THIERS et al., 1999; SANTOS; FONSECA, 2007).

A CCS óptica realizada por microscopia direta é mais aplicada em pesquisas, pois além de determinar o número absoluto de células, é possível diferenciar e quantificar as células polimorfonucleares e mononucleares presentes na secreção láctea pela observação ao microscópio comum de esfregaços de leite fixados e corados em lâminas (BENITES; MELVILLE; COSTA, 2001). Realizando a diferenciação celular é possível identificar o tipo celular predominante e, conseqüentemente, avaliar se a resposta inflamatória é aguda ou crônica (THIERS; BENITES; COSTA, 2001). Benites (1996) observou que o tipo de processo inflamatório está relacionado à espécie de microrganismo envolvido e seu padrão de lesão (aspectos macro e microscópicos) na glândula mamária.

3.5 MASTITE BOVINA INFECCIOSA

Praticamente todos os casos de mastite bovina de importância econômica são causados por microrganismos como bactérias, fungos, algas e vírus, isoladamente ou em associações, determinando, por exemplo, mastites bacterianas, mastites micóticas, ou mistas (WATTS, 1988; COSTA, 2002).

A mastite infecciosa também ocorre em maior quantidade em relação às demais e constitui um problema de saúde pública, pois muitos dos microrganismos presentes no leite de vacas com mastite são capazes de ocasionar infecções e toxinfecções alimentares ao homem (COSTA, 2002).

Infecções da glândula mamária causadas por bactérias patogênicas, além de ocasionarem riscos à saúde do consumidor, resultam em diminuição da produção de leite, alterações na composição láctea e celularidade, que variam de acordo com a intensidade e duração da infecção, e apresentam baixa porcentagem de cura espontânea, podendo

evoluir eventualmente para um quadro de septicemia e o animal acometido pode, em alguns casos, ir a óbito (HARMON, 1994; COSTA, 2002).

3.5.1 Agentes etiológicos

Apesar de haver relatos de mais de 137 espécies de microrganismos associados ao processo de mastite infecciosa verifica-se que os mais frequentemente encontrados são: *Staphylococcus* spp. (*Staphylococcus aureus*), *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*), *Corynebacterium* spp. (*Corynebacterium bovis*), coliformes (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.), *Pseudomonas aeruginosa* e *Arcanobacterium pyogenes*. Menos comumente, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma bovis*, estafilococos coagulase-negativos, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, e *Coxiella burnetti* são causadoras de mastite (WEIMER, 1998; BENITES, 2005; LANGONI, 2007; SANTOS; FONSECA, 2007).

Os principais agentes etiológicos da mastite são classificados de acordo com sua origem e modo de transmissão em dois grupos: microrganismos ambientais, ubiqüitários, presentes no ar, cama, água e fezes, e microrganismos contagiosos ou transmissíveis, geralmente transmitidos durante a ordenha, presentes principalmente no corpo do animal com e sem mastites (COSTA, 2002).

Os patógenos ambientais mais comuns são *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas* sp. Menos comumente pode ocorrer infecção por fungos, principalmente leveduras, e até por algas aclorofiladas (*Prototheca* spp.) (COSTA, 2002). A infecção por estes microrganismos pode ocorrer durante a ordenha, mas o contato primário geralmente acontece entre as ordenhas, quando a vaca entra em contato com o solo, fômites, etc. Aproximadamente 70 a 80% das infecções por coliformes tornam-se clínicas (leite anormal, inchaço do úbere ou sintomas sistêmicos) e aproximadamente 50% das infecções por estreptococos ambientais desencadeiam sintomas clínicos (HARMON, 1994).

Os principais microrganismos contagiosos são: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium bovis* (COSTA, 2002). Nas mastites causadas por patógenos

contagiosos, o maior reservatório é a glândula mamária infectada e a infecção é disseminada entre as vacas durante a ordenha. Estas infecções tendem a ser crônicas e subclínicas, mas com episódios clínicos periódicos (HARMON, 1994).

Dentre os que causam mastite subclínica e acarretam importantes alterações das características físico-químicas do leite e perdas significativas na produção láctea, predominam o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae* (ERSKINE et al., 2003). *Corynebacterium bovis* e estafilococos coagulase-negativos são considerados patógenos menores e infecções por estes microrganismos causam apenas inflamação moderada, com CCS um pouco mais elevada do que a contagem de glândulas não infectadas. A infecção por estes tipos de patógenos também não está frequentemente associada à mastite clínica, importantes alterações na composição láctea ou grandes perdas na produção de leite (DOHOO; MEEK, 1982; HARMON, 1994).

O *C. bovis* é altamente contagioso, mas as mastites causadas por este agente são quase sempre subclínicas e leves, sendo classificado como um patógeno menor ou secundário (FONSECA; SANTOS, 2007). Por outro lado, outros autores o consideram relevante na etiologia das mastites (COSTA et al., 2005; LANGONI et al., 2007) e sugerem que o *Corynebacterium bovis* é responsável por alterações celulares significativas no leite. Victória et al. (2005) observaram mediana de 262×10^3 células/ml de leite em amostras de quartos microbiologicamente negativos e de 806×10^3 células/ml de leite para amostras positivas ao *C. bovis*.

Zani (2005) isolou o *Corynebacterium bovis* em 37,3% de 2946 amostras de leite de quartos mamários. Durante o período experimental observou-se a elevada capacidade infectante do *C. bovis*, já que a média de novos isolamentos foi de 2,48% de todos os quartos a cada semana e a taxa de transmissão por ordenha foi de 634 quartos ordenhados para cada novo isolamento. Os resultados demonstraram uma alta persistência do agente no quarto infectado, com baixa taxa de cura espontânea, e que a ordenha foi o momento crítico para a transmissão de *C. bovis* através de fômites, principalmente pelos insufladores da ordenhadeira. Segundo Brito et al. (1999), a elevada porcentagem de isolamento de *Corynebacterium bovis*, sugere que as práticas de desinfecção das tetas por imersão após a ordenha não estão sendo realizadas de maneira efetiva.

A alta prevalência de isolamento de *Corynebacterium bovis* nos últimos anos e o aumento significativo da celularidade do leite causada por infecções desse agente,

acarreta grandes perdas econômicas aos produtores e laticínios (BRITO et al., 1999; VICTÓRIA et al., 2005).

Uma vez no leite, os microrganismos começam a se multiplicar e vão, gradativamente, decompondo um ou mais dos seus componentes, causando alterações químicas irreversíveis, tais como a degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos, alterando o sabor, aspecto físico, etc., até o ponto de torná-lo inadequado para o consumo humano (CERQUEIRA; SENA, 1998; GUIMARÃES, 2002). O conhecimento sobre o conteúdo microbiano do leite pode ser usado no julgamento de sua qualidade sanitária, das condições de sua produção e da saúde da glândula mamária do rebanho (GUIMARÃES, 2002).

3.6 SISTEMA DE DEFESA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A imunidade na glândula mamária pode ser, assim como em outros sistemas, classificada em inata (ou inespecífica) e adaptativa (ou adquirida, ou específica). Para se estabelecerem na glândula mamária e iniciarem o processo infeccioso, os patógenos necessitam inicialmente escapar da resposta imune inata predominante durante os estágios iniciais da infecção e caracterizada por barreiras anatômicas, solúveis e celulares, que independem de um contato prévio com o agente patogênico. A imunidade adaptativa requer um contato prévio com o agente, como uma infecção anterior, para desencadear no organismo o processo de reconhecimento e eliminação específico a determinado microrganismo (VAZ, 2007; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

Após a penetração do agente pelo canal do teto, início do processo inflamatório e multiplicação do microrganismo no leite, toxinas, enzimas e componentes da parede celular podem ter uma ação direta sobre a função do epitélio mamário, mas também são capazes de estimular a produção de muitos mediadores da inflamação como componentes do complemento, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotoninas, interleucinas, fatores de necrose tumoral, interferons e outras citocinas. Os sintomas clássicos da inflamação incluem aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema, aumento do fluxo sanguíneo, marginação e migração de neutrófilos (polimorfonucleares, PMN), diminuição da atividade secretora da glândula mamária, dor e febre (HARMON, 1994).

As células PMN constituem a primeira linha de defesa da glândula mamária contra a invasão bacteriana. Os neutrófilos bovinos são atraídos por sinalizadores bioquímicos como citocinas e receptores quimiostáticos. Dependendo da intensidade desses sinais, grandes quantidades de PMN são recrutadas para as áreas de lesão tecidual da glândula mamária e para o leite ocasionando a elevação da CCS (HARMON, 1994; PAAPE et al., 2003; RAINARD; RIOLLET, 2006).

O recrutamento contínuo de neutrófilos no leite desempenha um papel de proteção para a glândula mamária. Numa glândula saudável (< 100.000 células somáticas/ml de leite), a maior parte das células somáticas são macrófagos e linfócitos, mas também há um pouco de neutrófilos e células epiteliais. Em caso de infecção por microrganismo, a quantidade e os tipos de células somáticas predominantes sofrem uma rápida transição, podendo alcançar mais de 1.000.000 de células somáticas/ml de leite com mais de 95% do total de leucócitos constituído por neutrófilos (KEHRLI JR.; SHUSTER, 1994), sendo que estes podem permanecer numerosos também nos processos crônicos (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997; PAAPE et al., 2002).

Além de diferenciar se há ou não um processo inflamatório na glândula mamária, a relação entre a quantidade de células somáticas no leite e o tipo celular predominante pode auxiliar na identificação do grau e evolução da inflamação. A defesa intramamária contra microrganismos invasores é dependente do aumento da quantidade de células PMN recrutadas para o interior da glândula mamária, enquanto que a resolução do processo inflamatório está relacionada com a diminuição do elevado número de PMN (PAAPE et al., 2003). Em geral, uma elevada CCS (por exemplo, 1×10^6 células/ml de leite) e uma alta proporção de neutrófilos (por exemplo, 90%), indicam a presença de uma inflamação aguda. Por outro lado, uma baixa CCS (por exemplo, 500.000 células/ml) e uma baixa proporção de neutrófilos (por exemplo, menos de 40%), associada a uma marcante infiltração de leucócitos mononucleares, podem indicar uma lesão crônica (BLOOD; RADOSTITIS, 1991; HARMON, 1994; BENITES et al., 2000).

Os mecanismos de defesa inata (imunidade celular) e adaptativa (imunidade humoral) da glândula mamária são muitas vezes eficazes na eliminação de um patógeno, mas fatores genéticos e fisiológicos podem alterar a resistência imunológica do organismo (KEHRLI JR.; SHUSTER, 1994). Se os microrganismos sobreviverem à resposta imediata do hospedeiro, a inflamação continuará, resultando na persistência da migração dos neutrófilos ao lúmen alveolar (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997).

As lesões causadas pela reação inflamatória e migração leucocitária ao parênquima mamário prejudicam a qualidade e a quantidade do leite produzido. No processo de reparação o tecido mamário lesionado poderá ser substituído por tecido de regeneração, recuperando a função de secreção láctea, ou poderá ser substituído por tecido fibroso, cicatricial, podendo levar à perda parcial ou total da glândula mamária acometida (HARMON, 1994; KEHRLI JR; SHUSTER, 1994).

3.7 USO DA ALOPATIA PARA TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA

Encurtar a duração das infecções intramamárias e reduzir o número de vacas leiteiras que atuam como fonte de infecção no rebanho são metas importantes de um programa de controle de mastites, e podem ser cumpridas por meio de tratamentos das mastites subclínicas durante a lactação e/ou no início do período seco (COSTA, 2002; REIS; SILVA; BRESCIA, 2003).

Na mastite subclínica não ocorre perda da função da glândula mamária ou da vida do animal e nenhuma perda econômica significativa ocorre devido ao período de espera pelo resultado do exame microbiológico. Entretanto, a maioria das infecções intramamárias subclínicas são crônicas e a utilização de antibiótico selecionado por testes *in vitro* apresenta resultado a campo inferior nas infecções crônicas quando comparado com infecções agudas. A menor taxa de cura das infecções crônicas provavelmente deve-se à má distribuição do medicamento administrado por via intramamária, devido à extensa área de fibrose e à formação de microabscessos na glândula. A terapia é administrada na premissa de que o custo desta será recompensado com o ganho de produção de leite após a eliminação da infecção e redução dos reservatórios infecciosos (ERSKINE et al., 2003).

Alguns trabalhos testaram a eficácia do tratamento da mastite subclínica com uso de antimicrobianos, de diferentes tipos, tanto individualmente, quanto em associação, por aplicação intramamária ou sistêmica. Autores como Langoni et al. (2000) demonstraram resultados satisfatórios obtendo cura microbiológica 21 dias após o término do tratamento de mastite subclínica durante a lactação, causada por *Staphylococcus aureus*, com enrofloxacin (Baytril[®]) administrada tanto por via intramamária (72% de cura), quanto por via sistêmica (75%). Nader Filho, Mangerona e Moura (2002) estudaram a eficácia da

suspensão intramamária de longa ação contendo ampicilina trihidratada (250 mg) e cloxacilina benzatina (500 mg) (Prevmas[®]) administrada imediatamente após a última ordenha da lactação e verificaram, ao final de quatro semanas após o parto, 85,7% de cura microbiológica nos casos de mastite subclínica causados por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.

No entanto, outros trabalhos demonstraram que o tratamento da mastite subclínica com antibioticoterapia não é eficaz e nem viável economicamente, principalmente se realizado durante a lactação. Reis, Silva e Brescia (2003) observaram que 25 e 40 dias após o tratamento da mastite subclínica durante a lactação utilizando cefacetil sódico (cefalotina), os animais não apresentaram diferenças significativas em relação ao CMT e CCS e ocorreram reinfecções nos tetos tratados, observadas pelos isolamentos microbiológicos. Segundo Zafalon et al. (2007), o tratamento da mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* durante a lactação, com gentamicina, apesar das elevadas taxas de cura microbiológica e redução da CCS, não resultou em aumento da produção de leite dos quartos tratados e demonstrou ser economicamente inviável.

O uso continuado, muitas vezes de forma indevida, de um determinado antibiótico no tratamento da mastite, desencadeia um processo de seleção dos microorganismos que possibilita o surgimento de cepas resistentes ao princípio ativo. Desta forma, a indústria sintetiza continuamente novos produtos químicos, contribuindo para um círculo vicioso que gera dependência destes insumos no processo produtivo, com consequências indesejáveis no custo de produção (MITIEDRO, 2002). Um dos fatores responsáveis pelo aumento dos custos é o período de carência necessário para o aproveitamento do leite após a administração de antibióticos e quando este não é respeitado, detectam-se resíduos de antimicrobianos nos produtos lácteos disponíveis no mercado (COSTA, 2002; COELHO, 2003; NERO et al., 2007).

Raia (2006) estudou a presença de resíduos de antimicrobianos no leite além do período recomendado para descarte, observando 41,9% de ocorrência de resíduos nos quartos tratados durante a lactação, e mesmo no grupo que recebeu a terapia de vaca seca, constatou-se 23,2% de presença de resíduos.

A ocorrência de resíduos antimicrobianos no leite mesmo após o período recomendado para descarte pode ocasionar perdas econômicas por problemas técnicos no processamento de produtos lácteos, já que a presença destes pode retardar ou até impedir processos microbiológicos necessários para a fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos derivados. Além disso, afeta a saúde pública pela possibilidade de

transmissão desses resíduos aos consumidores podendo causar efeitos tóxicos, como reações de hipersensibilidade, e contribui para a seleção de microrganismos de múltipla-resistência (COSTA, 2002; RAIÁ, 2006).

Outro problema gerado pelo aumento da frequência do uso de antimicrobianos na rotina da propriedade para tratamento da mastite subclínica é o impacto negativo ao meio ambiente, com a contaminação do solo e da água (SANDGREN; WALLER; EMANUELSON, 2008).

Atualmente, a recomendação internacionalmente aceita consiste no tratamento antibiótico da mastite subclínica na última ordenha, ao final da lactação do animal, no início do período seco. Os custos com diagnóstico, medicamentos, descarte do leite, proporção do medicamento que será diluído e eliminado com o leite na ordenha subsequente e a taxa de cura bacteriológica (não superior a 50% em infecções por estafilococos), fazem com que o tratamento com antimicrobianos da mastite subclínica na lactação seja considerado antieconômico (COSTA, 2002).

3.8 HOMEOPATIA

Inviabilidade econômica, impacto ambiental negativo e resíduos de antimicrobianos são alguns dos motivos pelos quais outros tipos de terapêutica estão sendo propostos para prevenção e tratamento de doenças em sistemas de produção animal (MITIEDRO, 2002).

Neste contexto a Homeopatia é uma alternativa muito importante uma vez que os medicamentos homeopáticos apresentam baixos custo e toxicidade, facilidade de administração e não atuam diretamente sobre o microrganismo, não gerando assim, resistência microbiana. Estes medicamentos atuam na promoção do aumento da capacidade de resposta do hospedeiro. Além disso, é uma forma de tratamento permitida e recomendada nas legislações de produção animal orgânica e reconhecida como especialidade médica veterinária junto ao Conselho Federal de Medicina Veterinária do Brasil (BENITES, 2005).

A idéia de Homeopatia foi referida pela primeira vez por Hipócrates (460 - 370 a.C.) que utilizou a “Lei dos Semelhantes”, onde “O semelhante cura o semelhante”, em um de

seus aforismos: “O que produz a estrangúria, cura a estrangúria; o que causa o vômito, cura o vômito; o que dá febre a um homem são, cura um homem que tem febre” (BENITES, 2002).

A Homeopatia (derivada do grego, *Homoios* = semelhante e *pathos* = sofrimento) teve seu grande marco com Samuel Hahnemann (1755-1843), que sistematizou todos os conhecimentos relativos a esta ciência num corpo médico lógico e unitário, complementado por uma terapêutica prática e coerente (BENITES, 2002).

A partir da *Lei dos Semelhantes* e do *Vitalismo* (condição que rege e harmoniza o ser vivo; fenômeno imaterial que inexistente na substância morta e que caracteriza a vida), surgiram três princípios essenciais à prática da Homeopatia: o princípio da *experimentação no indivíduo sadio*, que consiste no estudo de cada medicamento homeopático pela experimentação em indivíduos sadios a fim de determinar as respostas dos diferentes organismos ao estímulo de um mesmo medicamento, o princípio da *individualização*, que se aplica pelo conhecimento do indivíduo como um todo para que se possa definir qual remédio deve ser administrado a um determinado paciente, num determinado momento, e o princípio da *dinamização* que implica na *diluição* do medicamento homeopático na escala centesimal (C ou CH), cinquenta milesimal (LM) ou decimal (D, X ou DH), com *sucussões*, ou seja, agitações, após cada diluição, para resultar na *potência* do medicamento (BENITES, 2002; BENITES, 2005).

A partir do princípio hipocrático da *individualização* foi estabelecido o conceito de *indivíduo total*, que nada mais é do que um ser indivisível, uma interação e não uma soma de partes. Uma patologia é o reflexo de um todo e nele contida e nunca produto da alteração de uma parte isolada desse organismo. Por isso, o *medicamento único* torna-se necessário ao tratamento do indivíduo, uma vez que a técnica de experimentação dos medicamentos constituiu-se pela experimentação de uma droga de cada vez. Cada um dos medicamentos consiste num todo, correspondendo ao todo indivisível do organismo para um determinado momento (BENITES, 2002).

Quando se trata de uma população em surto ou epidemia, englobam-se os indivíduos afetados em uma única imagem com todos os sinais clínicos presentes, tratando todos os indivíduos acometidos como se fosse um único ser vivo, com um mesmo medicamento, denominado “gênio medicamentoso”. Este também pode ser prescrito de forma preventiva para todos os indivíduos que se encontram nas áreas com risco de contaminação e que ainda não apresentam o quadro clínico (BENEZ, 2002). A

Homeopatia concentra-se no paciente, estimulando seu sistema imunológico, dando-lhe condições de reagir, impedindo que doenças se instalem no seu organismo. Assim, pode-se também trabalhar de maneira preventiva (MITIEDRO, 2002).

As doenças foram classificadas por Hahneman em agudas e crônicas. Segundo ele, as *doenças agudas* ou matam o indivíduo ou se curam espontaneamente. Nas doenças crônicas, por sua vez, “*o contágio parasitário semivital*” persiste, mais ou menos latente. Portanto, do ponto de vista homeopático, a evolução da doença é que determina se a doença é aguda ou crônica (BENITES, 2002).

Em relação às doenças crônicas, Hahnemann descreveu três “*contágios parasitários crônicos*”: as doenças venéreas, *Sycosis* e *Syphillis*, e a “*doença mais terrível, inveterada, velha de séculos*”, que ele designou por *Psora*. O tratamento da *Syphillis* se dá pela administração de *Mercurius* e até o presente momento não se observou doença semelhante nos animais. Na Medicina Veterinária, a *Sycosis* é a papilomatose causada pelo Papovavirus, caracterizada por excrescências verrucosas secas, esponjosas, macias e embebidas em líquido fétido, sangrantes, como couve-flor, localizadas na boca, língua, palato, lábios, nas axilas, no pescoço e nos órgãos genitais. Quanto ao tratamento, Hahnemann propõe a utilização de *Thuja occidentalis*, e posteriormente *Nitric acidum* potencializado, deixando cada um atuar o tempo suficiente até que cesse a sua ação (BENITES, 2002; BENITES, 2005).

Hahnemann (1999) descreve que as doenças causadas pela *Psora* são: “quase que todas as formações fortuitas, desde a verruga comum até o maior dos tumores sarcomatosos; desde malformações nas unhas até o inchaço dos ossos e o encurvamento da coluna, bem como muitos outros amolecimentos e deformidades dos ossos, tanto em idade precoce quanto mais avançada. Assim, também a epistaxe frequente; o acúmulo de sangue nas veias do reto e do ânus; descargas de sangue por parte do mesmo (hemorróidas secas ou sangrentas); hemoptise; hematêmese; hematúria; descargas menstruais deficientes ou demasiadamente frequentes; suores noturnos de muitos anos de duração; ressecamento da pele; diarreia de muitos anos de duração, bem como constipação permanente e dificuldade na evacuação, dores erráticas e prolongadas, convulsões que ocorrem repetidamente ao longo de alguns anos; úlceras e inflamações crônicas; (...); em síntese, milhares de transtornos crônicos da humanidade, referidos pela patologia com variedades de nomes são com poucas exceções verdadeiros descendentes desta única e multifacetada *Psora*”.

Uma doença crônica, após ter progredido e se desenvolvido até certo ponto, não poderá ser resolvida pela mais saudável das dietas ou pelo mais salutar tipo de vida e não desaparecerá por si própria (HAHNEMANN, 1999).

Nas doenças crônicas que se originam da *Psora*, devem ser administrados os medicamentos denominados antipsóricos, escolhidos de acordo com os sintomas apresentados pelo doente e com aqueles observados nas experimentações medicamentosas. Existem 53 antipsóricos catalogados (Quadro 2) e, como regra geral para casos crônicos, deve-se iniciar o tratamento com potências médias (18 a 30 centesimal) (BENITES, 2002; BENITES, 2005).

Medicamentos antipsóricos de Hahnemann		
<i>Agaricus</i>	<i>Conium maculatum</i>	<i>Natrum carbonicum</i>
<i>Alumina</i>	<i>Cuprum</i>	<i>Natrum muriaticum</i>
<i>Ammonium carbonicum</i>	<i>Digitalis purpúrea</i>	<i>Nitric acidum</i>
<i>Ammonium muriaticum</i>	<i>Dulcamata</i>	<i>Nitrum</i>
<i>Anacardium orientale</i>	<i>Euphorbium</i>	<i>Petroleum</i>
<i>Antimonium crudum</i>	<i>Graphites</i>	<i>Phosphoricum acidum</i>
<i>Arsenicum album</i>	<i>Guajacum</i>	<i>Phosphorus</i>
<i>Aurum</i>	<i>Hepar sulphuris</i>	<i>Platina</i>
<i>Baryta carbonica</i>	<i>Iodium</i>	<i>Sarsaparilla</i>
<i>Borax veneta</i>	<i>Kali carbonicum</i>	<i>Sepia succus</i>
<i>Calcarea carbonica</i>	<i>Lycopodium</i>	<i>Silicia terra</i>
<i>Carbo animalis</i>	<i>Magnesia carbônica</i>	<i>Stannum</i>
<i>Carbo vegetalis</i>	<i>Magnesia muriatica</i>	<i>Sulphur</i>
<i>Causticum</i>	<i>Manganum</i>	<i>Sulphuricum acidum</i>
<i>Clematis erecta</i>	<i>Mezereum</i>	<i>Zincum</i>
<i>Colocynthis</i>	<i>Muriaticum acidum</i>	
Medicamentos antipsóricos acrescentados por Bönninghausen		
<i>Belladonna</i>	<i>Bovista</i>	<i>Senega</i>
<i>Boracicum acidum</i>	<i>Rhododendron</i>	<i>Strontium</i>

Quadro 2- Relação de medicamentos antipsóricos cujas matérias médicas puras estão descritas na segunda parte do livro Doenças Crônicas de Hahnemann e a relação de medicamentos antipsóricos que Bönninghausen acrescentou – Benites - 2002

No parágrafo 171 do “Organon da arte de curar” verifica-se que Hahnemann afirma que na *Psora* frequentemente é necessário administrar diversos medicamentos antipsóricos seguidamente, porém de maneira que cada um seja homeopaticamente escolhido em concordância com o grupo de sintomas restantes após o término da ação do

remédio anterior, para que se possa efetuar a cura (HAHNEMANN, 1995; BENITES; MELVILLE, 2003).

A prática da Homeopatia requer a necessidade de comparação dos sintomas apresentados pelo doente com aqueles observados nas experimentações medicamentosas, o que permite a escolha correta do remédio a ser utilizado em cada caso (BENITES, 2005).

Os resultados das experimentações dos medicamentos homeopáticos encontram-se registrados em livros denominados **Matéria Médica Pura**, publicados por Hahnemann e também por outros médicos. Devido à grande quantidade de medicamentos homeopáticos testados e à grande quantidade de sintomas descrita nas Matérias Médicas Puras, é praticamente impossível para o médico veterinário registrar em sua memória os sinais clínicos associados a cada medicamento de que pode fazer uso. Por esta razão, a partir de 1833 foram editados os primeiros dicionários da **Matéria Médica**, chamados de **Repertórios de Matéria Médica Homeopática**. Enquanto que na Matéria Médica estão relacionados os sintomas provocados por cada medicamento, no Repertório, para cada sintoma estão relacionados todos os medicamentos capazes de causá-los quando das experimentações (BENITES, 2002).

A escolha do medicamento se faz através da escolha da *síndrome mínima de valor máximo* (principais sinais clínicos que caracterizam a doença e o desequilíbrio do organismo), da repertorização e da comparação do quadro clínico com as Matérias Médicas (BENITES, 2002).

Seguindo a técnica homeopática de *dinamização* e o princípio da *Lei dos Semelhantes*, outros tipos de medicamentos, denominados nosódios ou bioterápicos ou isoterápicos são aplicados na prática da homeopatia. Os bioterápicos são preparações medicamentosas potencializadas homeopaticamente, obtidas a partir de produtos biológicos: secreções, excreções, tecidos e órgãos, produtos de origem microbiana, alérgenos (MITIEDRO, 2002).

No período entre 1831 a 1833, Joseph Lux, um veterinário alemão, trabalhou utilizando nosódios ou bioterápicos no tratamento de doenças específicas. Lux utilizou o *Anthracinum* no tratamento de bovinos com carbúnculo hemático. A isoterapia tem sido muito utilizada em medicina veterinária com o objetivo de tratar e ou prevenir doenças infecto-contagiosas cujos agentes etiológicos sejam conhecidos (SAXTON; GREGORY, 2005).

3.8.1 Homeopatia para Prevenção e Tratamento da Mastite Bovina

Há trabalhos que testaram diferentes protocolos terapêuticos homeopáticos, utilizando medicamentos únicos, complexos homeopáticos ou bioterápicos, com o objetivo de avaliar a eficácia dos tratamentos para prevenção e cura de mastites clínicas e subclínicas em rebanhos bovinos leiteiros.

No trabalho realizado por Almeida (2004) com vacas inoculadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus* para indução de mastite infecciosa aguda, e submetidas a ordenhas múltiplas, um grupo de animais foi tratado com medicamento homeopático (*Phytolacca decandra* 6CH, *Calcarea carbonica* 6CH ou *Silicea terra* 6CH) administrado individualmente, de acordo com sinais clínicos apresentados por cada indivíduo, e outro foi tratado com cefoperazona sódica. Concluiu-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, cada aplicação de antibiótico teve em média o custo de R\$4,50/bisnaga, enquanto que o custo do tratamento com homeopatia foi de aproximadamente R\$0,04/animal, a cada três dias.

Para tratamento da mastite clínica de vacas leiteiras, Varshney e Naresh (2005) utilizaram a combinação de *Phytolacca decandra* 200 CH, *Calcarea fluorica* 200 CH, *Silicea* 30 CH, *Belladonna* 30 CH, *Bryonia alba* 30 CH, *Arnica montana* 30 CH, *Conium maculatum* 30 CH e *Ipecacuanha* 30 CH, administrada via oral quatro vezes ao dia, até a recuperação do animal e da glândula mamária. Ao mesmo tempo outro grupo de vacas com mastite clínica foi tratado com medicamentos alopáticos (antibiótico e antiinflamatório). Para as vacas com mastite clínica não fibrosada, o complexo homeopático mostrou-se mais efetivo e econômico do que o tratamento alopático, pois o grupo tratado com homeopatia obteve 86,6% de cura, numa média de 7,7 dias de recuperação e custo total de US\$0,47, enquanto que o grupo correspondente tratado com alopacia obteve taxa de cura de 59,2%, com média de 4,5 dias de período de recuperação e custo total de US\$3,28.

Mitiedro (2002) desenvolveu um trabalho no qual um grupo de vacas leiteiras foi medicado com *Lac vaccinum defloratum* 12CH, *Carbo animalis* 12CH, *Phytolacca decandra* 12CH, *Pulsatilla nigricans* 12CH, *Sulphur* 12CH, *Silicea* 30CH, bioterápico *Staphilococcinum* 12CH, autoisoterápico 30CH e pomada fitoterápica de *Stryphnodendron barbatimao* (Barbatimão), com o intuito de tratar e prevenir mastites clínicas e subclínicas e, além destes, também foram administrados outros medicamentos bioterápicos e

homeopáticos para controlar a infestação por endo e ectoparasitas. O outro grupo foi mantido sob tratamento com as mesmas finalidades, mas com a administração de medicamentos alopáticos (vermífugos, carrapaticidas, bernicidas, antibióticos, antiinflamatórios, etc.). Neste estudo observou-se a manutenção da sanidade dos animais do grupo tratado com homeopatia e fitoterapia, de forma semelhante ao grupo tratado com alopatia, constatando-se a viabilidade de sua aplicação na bovinocultura leiteira.

Para tratamento de mastite bovina subclínica Barzon et al. (2008) utilizaram um complexo homeopático incluindo *Phosphorus* 30D, *Phytolacca decandra* 30D, *Silicea* 30D, *Sulphur* 30D, *Belladonna* 30D, *Bryonia* 30D, *Pulsatilla nigricans* 30D, *Calendula officinalis* 30D e bioterápico de *Staphylococcus aureus* 200D, administrado duas vezes ao dia, junto ao sal mineral, durante 75 dias. Os escores obtidos no CMT realizado a cada duas semanas demonstraram significativa regressão no decorrer do trabalho, e a CCS realizada no início e no final do experimento apresentou diminuição em 82% dos animais (5 animais tiveram diminuição de 0 a 25%, 11 entre 51 e 75%, 6 entre 76 e 100% e 3 animais apresentaram um aumento).

Nóbrega et al. (2009) realizaram tratamento homeopático de mastite subclínica com administração diária, via oral, durante dois meses, de um complexo composto por *Phytolacca decandra* 12CH, *Lachesis* 12CH, *Belladonna* 12CH, *Phosphorus* 30CH, *Bryonia* 12CH, *Conium maculatum* 12CH, *Apis mellifera* 30CH, *Mercurius solubilis* 12CH e *Pyrogenium* 6CH, e observaram que o grupo experimental apresentou redução significativa do escore do CMT quando comparado ao grupo controle. Resultado semelhante também foi obtido no trabalho de Searcy, Reyes e Guajardo (1995), no qual o grupo tratado recebeu complexo homeopático contendo *Phytolacca decandra* 200CH, *Phosphorus* 200CH e *Conium maculatum* 200CH. Neste estudo os animais receberam o medicamento via oral, durante 30 dias, sendo que a frequência de administração das doses foi diminuindo no decorrer do mês. Nas duas primeiras semanas a medicação foi dada a cada 48 horas, na terceira semana os animais foram medicados duas vezes e na última semana foram medicados apenas uma vez.

Para controle e tratamento da mastite subclínica durante a lactação de vacas em sistemas orgânicos de produção leiteira, Galdino (2009) avaliou o efeito da administração via oral, diariamente, durante quatro semanas, do mesmo complexo homeopático utilizado por Nóbrega (2009), mas a potência escolhida para todos os medicamentos foi a 6CH. Foram realizados CMT, CCS e cultivo microbiológico quatro semanas antes do tratamento e quatro semanas durante o tratamento. Os resultados do CMT não sofreram alterações,

mas constatou-se que a mediana da CCS das semanas com administração do medicamento foi significativamente inferior ($p < 0,0001$) à sem tratamento e que houve aumento na frequência de isolamentos bacterianos ($p < 0,05$) durante o tratamento.

Em experimento realizado por Mangiéri Jr. (2007), no qual se utilizou o medicamento *Phytolacca decandra* CH6 para tratamento da mastite subclínica durante a lactação, administrado via oral, duas vezes ao dia, durante 15 dias, apesar de não terem sido verificadas alterações nas CCS, observou-se diferença significativa na produção láctea das vacas tratadas em relação ao grupo controle ($p < 0,005$). As vacas tratadas homeopaticamente aumentaram sua produção em 2,5 kg de leite por dia, enquanto que as não tratadas não apresentaram diferença significativa na produção.

Assim como Mangiéri Jr. (2007), Almeida (2009) também utilizou o medicamento *Phytolacca decandra* para tratamento de mastite subclínica durante a lactação. No entanto a potência escolhida foi a 30CH e o medicamento foi administrado quinzenalmente a um grupo e mensalmente a outro, durante um período de três meses. Verificou-se que não houve diferença significativa entre a produção láctea, CCS e a presença de microrganismos na secreção láctea das glândulas, nem comparando os resultados obtidos dentro de cada grupo, antes e depois do tratamento homeopático, e nem quando comparados os resultados dos grupos tratados e grupo controle.

Almeida et al. (2005) utilizaram um bioterápico preparado com o leite proveniente das glândulas mamárias com mastite subclínica das vacas que seriam tratadas, na potência 12CH, administrado via oral, três vezes ao dia, no decorrer de 21 dias, durante a lactação. Neste trabalho observou-se que a taxa de cura microbiológica de 72,72% dos tetos tratados com bioterápico foi significativamente maior ($p < 0,01$) quando comparada com o grupo que recebeu placebo (28,57%).

Todos os assuntos abordados anteriormente no texto acima, envolvendo viabilidade econômica, segurança alimentar e a falta de pesquisas sobre a homeopatia na área de produção animal, principalmente de acordo com os princípios estabelecidos por Hahnemann, justificam o estudo sobre a eficácia do tratamento da mastite subclínica durante a lactação utilizando medicamento homeopático antipsórico e observando sua influência sobre os parâmetros de avaliação da saúde da glândula mamária, para melhor definir as condutas homeopáticas a serem implantadas nos rebanhos bovinos leiteiros.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas ao todo 210 amostras de leite provenientes de 26 vacas de aptidão leiteira da raça Holandesa, PC (Pura por Cruzamento) e 7/8, da Fazenda Canchim, São Carlos/SP, sede do Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste - CPPSE da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.

A alimentação do rebanho bovino leiteiro consistia em regime de pastoreio em pastagens de alfafa, aveia e azevém, com suplemento composto por caroço de algodão, silagem de milho ou sorgo e com concentrado de farelo de milho e soja, sal e uréia.

O sistema de ordenha era mecânico a vácuo, com realização de *pré-dipping* com solução clorada e *pós-dipping* com produtos à base de iodo. As vacas eram ordenhadas duas a três vezes por dia, dependendo da produção de leite.

Tanto o manejo de ordenha, quanto a dieta alimentar dos animais, não sofreram modificações durante os seis meses de experimento.

As análises laboratoriais foram realizadas utilizando-se as instalações do Laboratório de Microbiologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ/USP), São Paulo, SP, e os serviços da Clínica do Leite, Esalq-USP, Piracicaba, SP.

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Para compor os grupos do experimento foram previamente selecionadas as vacas que se encontravam entre o terceiro e o sexto mês de lactação e entre a segunda e a quinta cria, com o objetivo de formar grupos homogêneos e minimizar variações no CMT, contagem de células somáticas (CCS), produção e composição do leite, relacionadas aos estágios e número de lactações (ZAFALON, 2005).

Para selecionar apenas os animais com mastite subclínica foram realizados os seguintes testes:

4.1.1 Exame Físico

Neste exame foram selecionadas as vacas que apresentavam bom estado geral e com ausência de sinais clínicos de mastite à inspeção e à palpação das glândulas mamárias.

4.1.2 Prova de Tamis

Para a avaliação do leite da glândula mamária, foi realizada a Prova de Tamis ou *strip cup* (BLOOD; RADOSTITS, 1991) e apenas foram selecionadas as fêmeas lactantes que não apresentaram alterações macroscópicas nos primeiros jatos de leite, como grumos, pus e estrias de sangue.

4.1.3 California Mastitis Test (CMT)

O procedimento adotado foi baseado na metodologia de Schalm e Noorlander (1957). Após a retirada dos primeiros jatos de leite antes da ordenha, foram ordenhados 2 a 3 ml de leite de cada glândula mamária diretamente no respectivo recipiente da placa do CMT e adicionado na mesma proporção um detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio) capaz de emulsificar os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite, com conseqüente liberação de material nucléico, sendo que o DNA liberado sofre uma reação de gelificação proporcional à quantidade de células presentes. Agitou-se a mistura por aproximadamente 10 segundos e em seguida foi feita a leitura do teste. As reações foram classificadas como negativa (0; sem formação de gel), 1+ (leve formação de gel), 2+ (formação de gel espesso bem definido) e 3+ (gel bastante espesso, assentando no fundo da placa). Para o experimento somente foram selecionadas as amostras de leite provenientes de vacas cujas glândulas mamárias apresentaram leite com CMT 2 ou 3 cruces.

4.2 ETAPAS DO EXPERIMENTO

O experimento foi desenvolvido em duas etapas com duração de três meses cada uma, utilizando-se medicamentos homeopáticos distintos e em frequências de administração diferentes.

Em cada uma das etapas, as vacas selecionadas após os testes de triagem foram distribuídas aleatoriamente entre o grupo do medicamento homeopático (Grupo Homeopatia) e o grupo do medicamento placebo (Grupo Placebo), mantendo os grupos com um número aproximado de animais.

Devido ao intervalo de lactação pré-estabelecido, os animais da primeira etapa não puderam ser mantidos na segunda. Por isso, a seleção dos animais foi novamente realizada no início da segunda etapa.

4.2.1 Etapa I

Na Etapa I foram analisadas ao todo 138 amostras de leite provenientes de 46 glândulas mamárias de 15 animais, sendo que 7 vacas pertenciam ao grupo tratado com o medicamento homeopático *Sulphur* 30 CH e 8 pertenciam ao grupo que recebeu medicamento placebo. Nesta etapa os animais receberam administração medicamentosa com intervalo mensal, durante três meses. O experimento foi realizado em duplo-cego.

4.2.2 Etapa II

Na Etapa II foram analisadas ao todo 72 amostras de leite provenientes de 24 glândulas mamárias de 11 animais, sendo que 6 vacas pertenciam ao grupo tratado com o medicamento homeopático *Calcarea carbonica* 30 CH e 5 pertenciam ao grupo que recebeu medicamento placebo. Os animais receberam administração medicamentosa com intervalo quinzenal, durante três meses. Nesta segunda etapa o trabalho não foi realizado em duplo-cego, pois o medicamento homeopático antipsórcico foi mudado

4.3 ESCOLHA DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO

Levando-se em consideração o conceito de “gênio medicamentoso” e que a mastite, segundo a classificação estabelecida por Hahnemann, é uma “doença crônica verdadeira”, ou seja, uma Psora, selecionou-se um medicamento homeopático antipsórico de acordo com as características gerais da mastite na população em estudo com o intuito de curar os animais com mastite subclínica e prevenir a ocorrência de mastite clínica. Com a finalidade de prevenção, foram também repertorizados os sinais clínicos que os animais poderiam apresentar se o quadro de mastite subclínica evoluísse para mastite clínica

Por tratar-se de um rebanho, cada medicamento utilizado foi escolhido com base no “gênio epidêmico” (BENEZ, 2002). Desta forma, foram considerados os principais transtornos do rebanho em questão de acordo com o histórico de doenças relatado pelos funcionários que lidavam diariamente com os animais e por observações de sinais clínicos durante a realização do trabalho. Os principais sintomas foram repertorizados (KENT, 2006) e em seguida foram consultadas as Matérias Medicas Puras de Allen (2005), Hahnemann (1994) e Hering (1994), para cuidadosa comparação entre o complexo sintomático característico dos animais e dos medicamentos, até descobrir aquele que provocasse os sintomas mais semelhantes aos do quadro em questão.

4.3.1 Repertorização

Para a repertorização dos sintomas foi utilizado o Repertório da Matéria Medica Homeopática de J. T. Kent (KENT, 2006). Na repertorização seleciona-se o medicamento que mais aparece nas rubricas consultadas e que possui, de preferência, a maior pontuação.

4.3.1.1 Etapa I

Na repertorização da primeira etapa foram utilizados os principais sinais clínicos, relatados pelos funcionários da propriedade e observados no início do experimento, relacionados aos quadros clínicos de mastite característicos dos animais do rebanho estudado (Quadro 3).

Sintoma Medicamento	<i>Inflammation mammarum</i>	<i>Induration mammarum</i>	<i>Swelling mammarum</i>	<i>Milk disappearing</i>	<i>Stool black</i>	Nº de Sintomas /Pontuação
Sulphur	3	2	2	1	1	5/9
<i>Agaricus</i>	-	-	-	1	1	2/2
<i>Alumina</i>	-	1	-	-	1	2/2
<i>Arsenicum album</i>	-	-	-	-	3	1/3
<i>Aurum metallicum</i>	-	-	-	1	-	1/1
<i>Belladonna</i>	2	2	2	-	-	3/6
Calcarea carbonica	1	2	2	2	2	5/9
<i>Carbo animalis</i>	2	3	2	-	-	3/7
<i>Carbo vegetabilis</i>	2	-	-	-	1	2/3
<i>Causticum</i>	-	-	-	2	1	2/3
<i>Clematis erecta</i>	1	2	2	-	-	3/5
<i>Colocynthis</i>	-	1	-	-	-	1/1
<i>Conium maculatum</i>	2	3	2	-	-	3/7
<i>Cuprum</i>	-	2	2	-	2	3/6
<i>Dulcamata</i>	-	1	2	3	1	4/7
<i>Graphites</i>	-	2	1	-	1	3/4
<i>Hepar sulphur</i>	3	-	2	-	2	3/7
<i>Iodium</i>	-	2	-	-	1	2/3
<i>Lycopodium</i>	2	2	1	1	-	4/6
<i>Natrum muriaticum</i>	-	-	-	-	2	1/2
<i>Nitric acidum</i>	-	1	-	-	2	2/3
<i>Phosphoricum ac.</i>	-	-	-	1	1	2/2
Phosphorus	2	2	2	1	2	5/9
<i>Platina</i>	-	-	-	-	2	1/2
<i>Rhododendron</i>	-	-	-	-	1	1/1
<i>Sepia succus</i>	-	2	-	1	1	3/4
<i>Silicea</i>	3	3	3	-	-	3/9
<i>Stannum</i>	-	-	-	-	1	1/1
<i>Sulphuricum acidum</i>	-	-	-	-	1	1/1
<i>Zincum</i>	-	-	2	2	1	3/5

1 = frequência que o medicamento causa o sintoma: baixa

2 = frequência que o medicamento causa o sintoma: média

3 = frequência que o medicamento causa o sintoma: alta

Quadro 3-Relação dos sintomas selecionados para escolha do medicamento homeopático antipsórcico a ser utilizado no tratamento de mastite subclínica e prevenção de mastite clínica dos animais da Etapa I, bem como a quantidade de sintomas apresentados e a pontuação destes de acordo com cada medicamento

4.3.1.2 Etapa II

No decorrer do experimento foram observados outros sinais clínicos, além dos repertorizados anteriormente, o que levou à mudança da síndrome mínima de valor máximo, ou seja, dos principais sinais clínicos que caracterizam a doença e o desequilíbrio do organismo, para a repertorização (Quadro 4).

Sintoma Medicamento	<i>Inflammation mammarum</i>	<i>Induration mammarum</i>	<i>Swelling mammarum</i>	<i>Milk disappearing</i>	<i>Ulceration mammarum</i>	<i>Caries of bone foot</i>	<i>Distorted nails</i>	Nº de Sintomas /Pontuação
Calc.	1	2	2	2	2	1	1	7/11
Agar.	-	-	-	1	-	-	-	1/1
Alum.	-	1	-	-	-	-	1	2/2
Aur.	-	-	-	1	-	-	-	1/1
Bell.	3	2	2	-	-	-	-	3/7
Carb-an.	2	3	2	-	-	-	-	3/7
Carb-v.	2	-	-	-	-	-	-	1/2
Caust.	-	-	-	2	-	-	-	1/2
Clem.	1	2	2	-	-	-	-	3/5
Coloc.	-	1	-	-	-	-	-	1/1
Con.	2	3	2	-	-	-	-	3/7
Cupr.	-	2	2	-	-	-	-	2/4
Dulc.	-	1	2	3	-	-	-	3/6
Graph.	-	2	1	-	-	-	3	3/6
Hep.	3	-	2	-	2	-	-	3/7
Iod.	-	2	-	-	-	-	-	1/2
Lyc.	2	2	1	1	-	-	-	4/6
Nit- ac.	-	1	-	-	-	-	-	1/1
Ph-ac.	-	-	-	1	-	-	-	1/1
Phos.	2	2	2	1	2	-	-	5/9
Sep.	-	2	-	-	-	-	2	2/4
Sil.	3	3	3	-	3	3	3	6/18
Sulph.	3	2	2	1	1	-	1	6/10
Zinc.	-	-	2	2	-	-	-	2/4

1 = frequência que o medicamento causa o sintoma: baixa

2 = frequência que o medicamento causa o sintoma: média

3 = frequência que o medicamento causa o sintoma: alta

Quadro 4-Relação dos sintomas selecionados para escolha do medicamento homeopático antipsórico a ser utilizado no tratamento mastite subclínica e prevenção de mastite clínica dos animais da Etapa II, bem como a quantidade de sintomas apresentados e a pontuação destes de acordo com cada medicamento

4.3.2 Matéria Médica

4.3.2.1 Etapa I

De acordo com a repertorização demonstrada pelo Quadro 3, os medicamentos *Calcarea carbonica*, *Phosphorus* e *Sulphur* tiveram a mesma classificação em relação à quantidade de sintomas e pontuação, e nas Matérias Médicas (HAHNEMANN, 1994; HERING, 1994; ALLEN, 2005) os três medicamentos cobrem o quadro repertorizado. No entanto, seguindo o princípio do *medicamento único* estabelecido por Hahnemann (1995), *Sulphur* foi escolhido por ser considerado um dos principais medicamentos homeopáticos, indicado para muitos casos, principalmente para o início de um tratamento de doença crônica (TYLER, 1992). Além disso, segundo Hahnemann, tanto nos casos agudos como nos casos crônicos, é indicado prescrever estimulantes e desbloqueadores da energia vital, como *Sulphur*, *Hepar sulphuris* e *Mercurius* (BENITES, 2002).

4.3.2.2 Etapa II

De acordo com o parágrafo 171 do “Organon da arte de curar”, na *Psora*, frequentemente é preciso administrar diversos medicamentos antipsóricos seguidamente, porém de maneira que cada um que venha depois seja homeopaticamente escolhido em consonância com o grupo de sintomas restantes após o término da ação do remédio anterior (HAHNEMANN, 1995).

Portanto, após a repertorização da segunda etapa (Quadro 4) selecionou-se o medicamento *Calcarea carbonica*, pois além de cobrir a totalidade dos sintomas, critério mais importante do que a pontuação, nas Matérias Médicas de Hahnemann (1994) e Hering (1994) é recomendada a administração de *Calcarea carbonica* após o uso de *Sulphur*.

4.3.3 Potência e frequência de administração do medicamento homeopático

O recomendado por Hahnemann é iniciar o tratamento com potências médias (18 a 30 centesimal); como regra geral, potências baixas (6 a 12 centesimal) para os casos mais orgânicos, ou lesionais; potências médias para os casos não muito graves e funcionais, e potências altas (200, 1000, 10000 centesimais) para os casos predominantemente mentais (BENITES, 2002). Por tratar-se de um processo crônico, optou-se por uma potência média (30 CH) e uma frequência baixa.

4.3.3.1 Etapa I

Foi administrado *Sulphur* 30CH, mensalmente, para o Grupo Homeopatia.

4.3.3.2 Etapa II

Foi administrado *Calcarea carbonica* 30CH, quinzenalmente, para o Grupo Homeopatia. O intervalo entre as medicações da segunda etapa foi menor a fim de observar possíveis mudanças em relação à frequência de administração do medicamento.

4.3.4 Vias de administração do medicamento homeopático

No momento das medicações, tanto na Etapa I quanto na Etapa II, eram dissolvidos em água dois glóbulos do medicamento homeopático e esta solução era aspergida na mucosa oronasal ou vaginal dos animais do grupo Homeopatia correspondente. Este método é denominado de *plus* de acordo com a descrição de Hahnemann (1995, 1999).

A administração do medicamento por essas vias era realizada enquanto os animais estavam contidos para a realização de uma das ordenhas diárias, o que facilitava a medicação, sem prejudicar o fluxo de trabalho da propriedade ou aumentar a quantidade de mão-de-obra.

4.3.5 Medicamento placebo

Tanto na Etapa I quanto na Etapa II, foram administrados glóbulos de lactose inerte aos animais do Grupo Placebo, na mesma frequência e modos de administração em que foram realizados os tratamentos homeopáticos.

4.3.6 Aquisição e custo dos medicamentos

Os medicamentos foram adquiridos em Farmácia Homeopática devidamente credenciada (Farmácia Artemisia - Manipulação de Medicamentos Homeopáticos), sendo que cada frasco contendo aproximadamente 250 glóbulos custou R\$ 13,00 em média.

4.4 AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Foram analisados parâmetros relacionados à sanidade da glândula mamária e à qualidade do leite para avaliar se os tratamentos estabelecidos alcançaram os objetivos propostos. Nas duas etapas as avaliações foram realizadas em três momentos com intervalo mensal entre cada uma, ou seja, antes, durante e depois do tratamento.

4.4.1 Exame Físico

Durante as avaliações eram realizadas a inspeção e a palpação das glândulas mamárias para verificar possíveis sinais clínicos de mastite.

4.4.2 Teste de Tamis

Este exame era realizado para observar possíveis alterações macroscópicas do leite, características de mastite clínica.

4.4.3 CMT

Seguindo a técnica descrita anteriormente, o CMT era realizado durante as avaliações para a detecção indireta de células somáticas e acompanhamento da evolução dos escores obtidos no teste.

4.4.4 CCS Eletrônica

Após a higienização dos tetos com algodão embebido em álcool iodado, amostras de leite foram colhidas e acondicionadas em frascos plásticos com capacidade para 50 ml contendo duas pastilhas de bronopol. As amostras foram enviadas à Clínica do Leite, Esalq-USP, Piracicaba, SP, para realização das contagens de células somáticas por citometria de fluxo, utilizando o equipamento Somacount 300[®] (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995).

No contador eletrônico de células somáticas Somacount 300[®], as amostras de leite têm os núcleos das células corados e expostos a um raio *laser*, refletindo luz vermelha (fluorescência), e os sinais são transformados em impulsos elétricos detectados por um

fotomultiplicador e, então, são transformados em número de células/ml de leite (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995).

4.4.5 CCS Óptica

As contagens de células somáticas por microscopia óptica foram realizadas para diferenciar as proporções de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) das amostras de leite, seguindo o método de Prescott e Breed (1910), modificado com a coloração de hematoxilina-eosina (HE) segundo Benites, Melville e Costa (2001).

No Laboratório de Microbiologia e Micologia do VPS-FMVZ/USP, um volume de 10 μ L de leite de cada amostra foi distribuído homogeneamente com o uso de micropipetador em uma área de 1cm² em lâmina de vidro previamente higienizada e desengordurada. Após a secagem durante 24 horas, os esfregaços foram fixados em metanol por 15 minutos e mantidos em temperatura ambiente até serem posteriormente corados com a coloração de HE pelo Laboratório de Patologia do VPT-FMVZ/USP.

Foram contadas 100 células de cada amostra em microscópio óptico comum, com objetiva de imersão 100x e ocular 10x, diferenciando quantas eram PMN e MN. Para cada amostra, o número absoluto total de cada tipo celular foi calculado multiplicando-se a porcentagem obtida na contagem por microscopia óptica pelo resultado da CCS eletrônica da amostra correspondente.

Técnica semelhante de contagem foi realizada por Piccinini et al. (1999), mas com a coloração de esterase descrita por Yam et al. (1971). Essa coloração permite a diferenciação de macrófagos, que são esterase-positivos, de células epiteliais, esterase-negativas, enquanto que leucócitos polimorfonucleares (PMN), linfócitos e macrófagos são diferenciados morfológicamente. Aproximadamente 100 células de cada amostra foram contadas e os resultados de diferenciação celular foram expressos pela proporção de cada tipo celular em relação ao número total de células contadas.

4.4.6 Exame Microbiológico

Após a higienização dos tetos com solução de formaldeído (Lisoform®), seguida de secagem com papel toalha descartável e posterior desinfecção com algodão embebido em álcool iodado, eram colhidos aproximadamente 10 ml de leite em tubos de vidro estéreis. As amostras de leite eram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia e Micologia do VPS-FMVZ/USP, São Paulo, SP, para a realização dos exames microbiológicos.

De cada amostra, 10 µl de leite eram espalhados na superfície de placas de Petri contendo meio ágar-sangue ovino a 5%, as quais permaneciam incubadas em aerobiose a 37°C para pesquisa bacteriana, com leitura às 24, 48 e 72 horas. Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com Lennette et al. (1985) e classificados segundo Kreeger-Van-Rig (1984); Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

4.4.7 Produção de Leite

Durante as duas etapas do experimento a produção leiteira dos animais de ambos os grupos foi mensurada quinzenalmente, de acordo com o manejo de rotina da propriedade.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o “software” GRAPHPAD INSTAT 1990-93.

Os testes estatísticos empregados nas diversas análises foram: Friedman para comparar os dados relativos à CCS log, PMN log e MN log dentro de cada grupo; Kruskal-Wallis para os mesmos dados e análise da produção leiteira, entre os diferentes grupos; análise de variância para a produção leiteira dentro do mesmo grupo; Teste T Pareado

para análise de PMN e MN dentro dos mesmos grupos e teste de Fisher para análise das frequências de microrganismos.

5 RESULTADOS

5.1 ETAPA I

5.1.1 Contagem de Células Somáticas

As contagens de PMN foram estatisticamente maiores ($P < 0,0001$) do que as contagens de MN durante toda a Etapa I, tanto no grupo tratado com *Sulphur* 30CH, quanto no grupo Placebo (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparações das medianas das avaliações de CMT, contagens totais de células somáticas (CCS), contagens totais e porcentagens de células polimorfonucleares (PMN) e de mononucleares (MN) dos grupos experimentais tratados com medicamento *Sulphur* 30CH e Placebo em repetições mensais. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos - 2008

			CMT	CCS x 10 ³	PMN		MN	
					x 10 ³	%	x 10 ³	%
Sulphur 30CH	Mês 01	Mín	2	200	123	56	74	13
		Mediana	3	614	461 ^a	68	180 ^a	32
		Máx	3	1.501	1.141	87	518	44
	Mês 02	Mín	1	76	51	57	25	11
		Mediana	2	599	497 ^b	74	135 ^b	26
		Máx	3	2.302	1.703	89	802	43
	Mês 03	Mín	1	78	54	56	24	11
		Mediana	3	697	418 ^c	67	197 ^c	33
		Máx	3	4.651	3.209	89	1.442	44
Placebo	Mês 01	Mín	2	206	150	55	25	12
		Mediana	3	628	357 ^d	75	163 ^d	25
		Máx	3	1.310	995	88	434	45
	Mês 02	Mín	1	72	59	54	12	15
		Mediana	2	652	391 ^e	74	173 ^e	26
		Máx	3	4.943	3.460	85	1.482	46
	Mês 03	Mín	0	26	18	51	7	11
		Mediana	2	344	259 ^f	72	137 ^f	28
		Máx	3	3.856	3.431	89	1.016	49

a,b,c,d,e,f = Medianas de PM estatisticamente significativas ($P < 0,0001$) quando comparadas às medianas de MN

5.1.2 Produção Leiteira

No grupo tratado mensalmente com *Sulphur* 30CH houve diminuição estatisticamente significativa da produção de leite entre o 16º dia após a primeira medicação e o 17º dia após a segunda medicação.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Mediana, mínimo e máximo da produção leiteira (L/dia) das vacas tratadas com *Sulphur* 30CH e Placebo mensalmente. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos - Estado de São Paulo - 2008

		11 dias antes da 1ª medicação	3 dias depois da 1ª medicação	16 dias depois da 1ª medicação	3 dias depois da 2ª medicação	17 dias depois da 2ª Medicação
Sulph 30CH	Mín	24,8	24,0	27,2	22,0	19,4
	Mediana	25,8	27,6	27,8 ^a	27,4	25,2 ^a
	Máx	33,6	34,6	34,8	29,4	35,0
Placebo	Mín	24,8	14,6	16,6	7,0	16,2
	Mediana	25,5	29,6	31,7	27,9	30,5
	Máx	33,6	37,4	44,8	38,4	33,8

a = Mediana da produção de leite 16 dias após a primeira medicação com *Sulphur* 30CH estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada à mediana do 17º dia após a segunda medicação, durante tratamento mensal

5.1.3 Avaliação Microbiológica

Em relação ao grupo tratado mensalmente com *Sulphur* 30CH, no primeiro mês, antes do início da medicação, a maior frequência de isolamentos de *Corynebacterium bovis* foi estatisticamente significativa quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus dysgalactiae*.

No segundo mês, durante o tratamento com *Sulphur* 30CH, houve maior frequência de *Corynebacterium bovis*, estatisticamente significativa em comparação à frequência de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*.

No terceiro mês, após o fim do tratamento com *Sulphur* 30CH, a frequência de *Corynebacterium bovis* foi maior e estatisticamente significativa quando comparada à frequência de isolamentos de *Streptococcus uberis*.

Além disso, houve diferenças estatisticamente significativas quanto aos isolamentos ao longo dos meses. A frequência de isolamentos com resultados negativos foi menor no segundo mês, em comparação ao primeiro e ao terceiro meses (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de isolamento de microrganismos nas amostras de leite do grupo tratado com *Sulphur* 30CH em administrações mensais. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos - Estado de São Paulo - 2008

MICROORGANISMO	ETAPA I					
	Mês 01		Mês 02		Mês 03	
	N	%	N	%	N	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	9	42,9 ^a	10	47,6 ^b	7	33,3 ^c
<i>Staphylococcus intermedius</i>	2	9,5 ^a	5	23,8	6	28,6
<i>Staphylococcus simulans</i>	3	14,3	0	0,0	0	0,0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0,0	1	4,8	0	0,0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	9,5 ^a	4	19,0 ^b	0	0,0
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0,0	1	4,8 ^b	1	4,8 ^c
Negativo	5	23,8 ^d	0	0,0 ^{de}	7	33,3 ^{de}
TOTAL	21	100	21	100	21	100

a = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa (P<0,05) quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus dysgalactiae*

b = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa (P<0,05) quando comparada à frequência de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*

c = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa (P<0,05) quando comparada à frequência de *Streptococcus uberis*

d = Frequência de resultado negativo do mês 01 estatisticamente significativa (P<0,05) quando comparada à frequência de resultado negativo do mês 02

e = Frequência de resultado negativo do mês 02 estatisticamente significativa (P<0,05) quando comparada à frequência de resultado negativo do mês 03

Quanto aos isolamentos microbiológicos do grupo que recebeu administrações mensais de Placebo, no primeiro mês do experimento o *Corynebacterium bovis* foi mais frequente, com diferença estatisticamente significativa em comparação à frequência de *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Streptococcus agalactiae* e

Streptococcus dysgalactiae. No segundo mês, o *Corynebacterium bovis* apresentou maior frequência, estatisticamente significativa, quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*. No terceiro mês de experimento o *Corynebacterium bovis* foi mais freqüente, com diferença estatisticamente significativa, do que *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus uberis*.

Não houve diferença significativa entre os microrganismos isolados, no decorrer dos meses (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência de isolamento de microrganismos nas amostras de leite do grupo tratado com Placebo em administrações mensais. Embrapa Pecuária Sudeste- São Carlos - Estado de São Paulo - 2008

MICROORGANISMO	ETAPA I					
	Mês 01		Mês 02		Mês 03	
	N	%	N	%	N	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	11	44,0 ^a	10	40,0 ^b	14	56,0 ^c
<i>Staphylococcus intermedius</i>	3	12,0 ^a	1	4,0 ^b	4	16,0 ^c
<i>Staphylococcus lutrae</i>	2	8,0 ^a	3	12,0	0	0,0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	4,0 ^a	2	8,0 ^b	0	0,0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	4,0 ^a	2	8,0 ^b	0	0,0
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0,0	0	0,0	1	4,0 ^c
Negativo	7	28,0	7	28,0	6	24,0
TOTAL	25	100	25	100	25	100

a = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*

b = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*

c = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus uberis*

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os microrganismos isolados do grupo tratado com *Sulphur 30CH* e os do grupo tratado com Placebo, ao longo do tratamento com intervalos mensais.

5.2 ETAPA II

5.2.1 Contagem de Células Somáticas

As contagens de PMN foram estatisticamente maiores do que as contagens de MN durante todo o experimento, tanto no grupo tratado com *Calcareia carbonica* 30CH ($P < 0,0001$), quanto no grupo Placebo ($P < 0,005$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparações das medianas das avaliações de CMT, contagens de células somáticas (CCS), contagens totais e porcentagens de células polimorfonucleares (PMN) e de mononucleares (MN) dos grupos experimentais tratados com medicamento *Calcareia carbonica* 30CH e Placebo em repetições quinzenais. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos - 2008

			CMT	CCS x 10 ³	PMN		MN	
					x 10 ³	%	x 10 ³	%
Calc carb 30CH	Mês 01	Mín	1	253	160	28	57	17
		Mediana	2	420	290 ^a	66	137 ^a	34
		Máx	3	4.787	3.064	83	1.723	72
	Mês 02	Mín	1	191	133	34	34	15
		Mediana	2	1.259	540 ^b	68	480 ^b	32
		Máx	3	5.652	4.069	85	1.583	66
	Mês 03	Mín	2	53	32	61	21	16
		Mediana	3	687	515 ^c	67	172 ^c	33
		Máx	3	9.999	6.299	84	3.700	39
Placebo	Mês 01	Mín	1	245	88	35	66	22
		Mediana	3	994	636 ^d	60	358 ^d	40
		Máx	3	5.147	4.014	78	1.861	65
	Mês 02	Mín	0	77	30	40	34	30
		Mediana	2	630	415 ^e	65	214 ^e	35
		Máx	3	1.548	835	70	712	60
	Mês 03	Mín	0	42	31	58	11	19
		Mediana	2	421	273 ^f	65	147 ^f	35
		Máx	3	1.691	1.031	81	659	42

a,b,c = Medianas de PM estatisticamente significativas ($P < 0,0001$) quando comparadas às medianas de MN

d,e,f = Medianas de PM estatisticamente significativas ($P < 0,005$) quando comparadas às medianas de MN

5.2.2 Produção Leiteira

Não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa nos índices de produção leiteira dos animais do grupo tratado quinzenalmente com *Calcareo carbonica* 30CH.

No grupo que recebeu administrações quinzenais de Placebo houve diminuição estatisticamente significativa da produção de leite três dias após a primeira medicação ($P < 0,05$) e quatro dias após a segunda medicação ($P < 0,01$). Na última pesagem após a terceira medicação, a produção de leite havia retornado aos índices iniciais.

Não houve diferenças significativas entre os dois grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Mediana, mínimo e máximo da produção leiteira (L/dia) das vacas tratadas com *Calcareo carbonica* 30CH e placebo quinzenalmente. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos - Estado de São Paulo - 2008

		12 dias antes da 1 ^a Medicação	3 dias depois da 1 ^a medicação	4 dias depois da 2 ^a medicação	2 dias depois da 3 ^a medicação	16 dias depois da 3 ^a medicação
Calc carb 30CH	Mín	21,2	18,6	21,2	19,8	18,4
	Mediana	29,3	26,3	26,1	24,1	27,2
	Máx	38,8	38,6	30,6	31,4	31,2
Placebo	Mín	28,4	26,4	17,4	14,4	26,6
	Mediana	32,2 ^{ab}	30,4 ^a	25,6 ^b	28,0	29,2
	Máx	37,0	34,6	27,0	29,8	30,4

a = Mediana da produção de leite 12 dias antes da primeira medicação com Placebo estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada à mediana de 3 dias após a primeira medicação, durante tratamento quinzenal

b = Mediana da produção de leite 12 dias antes da primeira medicação com Placebo estatisticamente significativa ($P < 0,01$) quando comparada à mediana de 4 dias após a segunda medicação, durante tratamento quinzenal

5.2.3 Avaliação Microbiológica

Na avaliação microbiológica anterior à primeira medicação do grupo tratado quinzenalmente com *Calcareo carbonica* 30CH, ocorreu uma maior frequência de isolamentos de *Corynebacterium bovis*, estatisticamente significativa, quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius* e resultados negativos. No segundo mês, o *Corynebacterium bovis* apresentou maior frequência, estatisticamente significativa, em comparação à frequência de *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus dysgalactiae*.

No terceiro mês não houve diferença entre a frequência de *Corynebacterium bovis* e a de outros microrganismos isolados.

Também não houve diferença significativa entre os microrganismos isolados, no decorrer dos meses (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência de isolamento de microrganismos nas amostras de leite do grupo tratado com *Calcareo carbonica* 30CH em administrações quinzenais. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos - Estado de São Paulo - 2008

MICROORGANISMO	ETAPA II					
	Mês 01		Mês 02		Mês 03	
	N	%	N	%	N	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	10	66,7 ^a	9	60,0 ^b	5	33,3
<i>Staphylococcus intermedius</i>	2	13,3 ^a	1	6,7 ^b	1	6,7
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	0,0	1	6,7 ^b	2	13,3
Negativo	3	20,0 ^a	4	26,6	7	46,7
TOTAL	15	100	15	100	15	100

a = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius* e resultados negativos

b = Frequência de *Corynebacterium bovis* estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada à frequência de *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus dysgalactiae*

Não houve diferenças estatisticamente significantes no decorrer dos meses entre os microrganismos isolados das amostras de leite do grupo que recebeu administração quinzenal de Placebo (Tabela 8).

Tabela 8 - Frequência de isolamento de microrganismos nas amostras de leite do grupo tratado com Placebo em administrações quinzenais. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos - Estado de São Paulo - 2008

MICROORGANISMO	ETAPA II					
	Mês 01		Mês 02		Mês 03	
	N	%	N	%	N	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	6	66,7	7	77,8	5	55,6
Negativo	3	33,3	2	22,2	4	44,4
TOTAL	9	100	9	100	9	100

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os microrganismos isolados do grupo tratado com *Calcareo carbonica* 30CH e os do grupo tratado com Placebo, ao longo do tratamento com intervalos quinzenais.

6 DISCUSSÃO

Um programa efetivo de controle da mastite deve estar baseado principalmente nas medidas de prevenção. É importante utilizar a terapia com o objetivo de auxiliar as defesas específicas e inespecíficas do animal na eliminação do microrganismo invasor. O sucesso terapêutico deve ser avaliado mais pela redução dos sintomas clínicos que pela total eliminação do patógeno da glândula mamária. O melhor parâmetro da eficácia do tratamento é, em última análise, a produção de leite (COSTA, 2002).

No presente trabalho não foram observadas diferenças estatísticas com relação à evolução da CCS e dos escores do CMT, nem no grupo tratado mensalmente com *Sulphur* 30CH e nem no grupo que recebeu administrações quinzenais de *Calcarea carbonica* 30CH. Esses parâmetros de saúde da glândula mamária também não apresentaram diferenças quando se comparou cada grupo Homeopatia com o grupo Placebo correspondente. Mangiéri Jr. (2007) e Almeida (2009) constataram resultados semelhantes, pois não observaram alterações significativas do CMT e da CCS no decorrer dos experimentos. No entanto, Searcy, Reyes e Guajardo (1995) e Nóbrega et al. (2009), observaram que o grupo que recebeu o complexo homeopático apresentou redução significativa do escore do CMT quando comparado ao grupo controle, enquanto que Galdino (2009) relatou que a mediana da CCS foi significativamente inferior ($p < 0,0001$) no período em que o medicamento homeopático estava sendo administrado aos animais. Barzon et al. (2008) também constataram diminuição dos escores do CMT e da CCS no decorrer do tratamento homeopático.

Quanto à diferenciação celular e quantificação das proporções de PMN e MN, observou-se que desde antes do início dos tratamentos as amostras de leite apresentavam mais células PMN do que MN. Esse padrão se manteve até o final de cada etapa.

Na Etapa I foi observado que as amostras de leite analisadas apresentaram maior quantidade de PMN do que de MN ($P < 0,0001$), tanto no grupo tratado com *Sulphur* 30CH, quanto no grupo Placebo. Na Etapa II, a quantidade de PMN das amostras de leite também foi significativamente maior do que a quantidade de MN, tanto no grupo medicado com *Calcarea carbonica* 30CH ($P < 0,0001$), quanto no grupo que recebeu placebo ($P < 0,005$).

De acordo com a literatura (BLOOD; RADOSTITIS, 1991; HARMON, 1994; BENITES et al., 2000), uma maior proporção de células PMN é característica de quadros inflamatórios agudos, com presença de alta celularidade.

A correlação entre CCS e a resposta imunológica da glândula mamária ainda não está muito esclarecida. Evidências sugerem que o aumento moderado da quantidade de células somáticas no leite pode ajudar a proteger o quarto mamário da mastite (BURVENICH et al., 2003). Bradley (2002) relatou que rebanhos com baixa CCS possuem maior incidência de mastite ambiental quando comparados com rebanhos que apresentam alta CCS, possivelmente porque o número inicial de leucócitos na glândula mamária influencia a velocidade de migração das células de defesa na resposta imunológica contra a evolução da mastite clínica.

A escolha dos protocolos terapêuticos homeopáticos baseou-se na classificação de doenças estabelecida por Hahnemann, de acordo com a qual a mastite subclínica é uma inflamação crônica, originada da *Psora*. Portanto, em cada etapa do experimento selecionou-se um medicamento antipsórico (*Sulphur* na Etapa I e *Calcarea carbonica* na Etapa II), numa potência média (30CH), administrado numa frequência baixa (mensalmente na Etapa I e quinzenalmente na Etapa II). No entanto, ao final do experimento, foram realizadas as análises ao microscópio óptico das amostras de leite fixadas em lâmina e constatou-se que apesar dos animais do rebanho em estudo apresentarem mastite subclínica, a resposta celular da glândula mamária (PMN>MN) demonstrou tratar-se de um processo inflamatório agudo. Esses dados sugerem a reavaliação dos protocolos terapêuticos propostos, pois apesar das escolhas de medicamento e potência corresponderem à doença crônica em questão, o padrão de resposta celular encontrado sugere que a frequência das medicações deveria ter sido maior.

Mesmo tratando-se de uma doença crônica, foi revelada uma resposta aguda do sistema imunológico do hospedeiro e quanto mais agudo o processo inflamatório, maior a quantidade de estímulo medicamentoso necessária. Conforme citado anteriormente, outros autores já demonstraram resultados positivos realizando tratamentos de mastite subclínica bovina com administrações diárias de medicamentos homeopáticos (ALMEIDA et al., 2005; MANGIÉRI JR. et al., 2007; BARZON et al., 2008; NÓBREGA et al., 2009; GALDINO, 2009).

No rebanho estudado, o *Corynebacterium bovis* foi o microrganismo predominante nos isolamentos microbiológicos, antes, durante e depois dos tratamentos estabelecidos

nas Etapas I e II. Portanto, constatou-se que não houve cura microbiológica com os tratamentos realizados. Alta frequência de isolamento de *C. bovis* e persistência do microrganismo na glândula mamária, mesmo após a administração de medicamentos homeopáticos para tratamento de mastite subclínica, também foram observados por Mangiéri Jr. et al. (2007); Almeida (2009) e Nóbrega et al. (2009).

A alta prevalência de *C. bovis* no rebanho estudado, durante todo o experimento, confirma o alto potencial contagioso desse agente que, apesar de na maioria dos casos ocasionar moderada elevação da CCS, é responsável por perdas econômicas significativas e também oferece riscos à saúde das pessoas, principalmente para os trabalhadores que lidam diretamente com os animais (COSTA et al., 1995; LANGONI et al., 1998; DULTY et al., 2003; VICTÓRIA et al., 2005; ACHERMANN et al., 2009).

Dependendo do agente etiológico envolvido na mastite infecciosa, podem ser observadas diferentes variações nas proporções dos tipos celulares da resposta imunológica da glândula mamária. Leitner et al. (2008) constataram que em infecções crônicas causadas por *Streptococcus dysgalactiae* houve predomínio de neutrófilos, sendo que esse mesmo padrão de distribuição das populações de leucócitos foi observado nas amostras de quartos mamários com infecção aguda provocada por *E. coli* e *S. aureus*. Já nas glândulas mamárias cronicamente infectadas por estafilococos coagulase negativos, a proporção de PMN foi maior, mas não diferente significativamente dos quartos mamários sem infecção. Nas contagens celulares realizadas por Piccinini et al. (1999) verificou-se que as amostras de leite dos quartos mamários infectados com *Staphylococcus aureus* apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) da proporção de PMN, quando comparadas com as amostras de leite negativas ao exame microbiológico.

No presente estudo foram observados a alta frequência de isolamento de *C. bovis* e o predomínio de células PMN nas amostras de leite analisadas, aspectos também constatados por Almeida (2009) em trabalho realizado com animais com mastite subclínica do mesmo rebanho utilizado nesse experimento. Tais resultados divergem dos encontrados por Benites (1996), que realizou exames microbiológicos e histopatológicos de amostras de leite, parênquima, cisterna da glândula, cisterna do teto e linfonodos mamários, verificando diferenças entre os padrões lesionais causados por diferentes microrganismos. O *Corynebacterium bovis* foi isolado no leite, cisterna da glândula e cisterna do teto, e nessas áreas observou-se predominante infiltrado mononuclear. Sordillo et al. (1989) observaram nos exames histológicos de parênquimas mamários colonizados por *Corynebacterium bovis*, morfologia semelhante a dos quartos não

infectados e verificaram uma maior ocorrência de macrófagos e linfócitos. Quanto à quantidade de neutrófilos não foi observada nenhuma diferença significativa entre quartos mamários infectados e não infectados, sugerindo que a persistência do *C. bovis* na glândula mamária provoca pouca alteração na concentração de leucócitos.

Na Etapa I, dentro do grupo tratado com *Sulphur* 30CH, a frequência de resultados microbiológicos negativos foi significativamente menor ($P < 0,05$) no mês 02, durante a realização do tratamento, quando comparada ao mês 01, antes do início da medicação, e ao mês 03, após o fim do tratamento. No entanto, resultados microbiológicos negativos podem ser atribuídos a diversos fatores como exigência de condições específicas para crescerem, técnica inadequada de isolamento, tempo inadequado para crescimento do agente, entre outros (NÓBREGA et al., 2009) .

Nas duas etapas não houve diferenças significativas entre os níveis de produção de leite do grupo Homeopatia e do grupo Placebo. No grupo Homeopatia da Etapa I, apesar da diminuição significativa ($P < 0,05$) da mediana da produção de leite entre a medição feita 16 dias após a primeira medicação e a mensuração de 17 dias após a segunda medicação, nesta última, a produção de leite foi semelhante à aferida no início do experimento. Resultado semelhante foi observado na Etapa II, na qual houve diminuição significativa da produção de leite no decorrer das três primeiras medições realizadas no grupo Placebo. No entanto, a mediana da última mensuração foi próxima à obtida no início da etapa.

Esses resultados diferem dos obtidos por Mangiéri Jr. et al. (2007), que apesar de não terem verificado alterações na CCS, observaram que as vacas tratadas com *Phytolacca decandra* 6CH aumentaram sua produção em 2,5 kg de leite por dia ($p < 0,005$), enquanto que o grupo controle não apresentou diferença significativa na produção.

Comparando trabalhos que utilizaram medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina, clínica ou subclínica, observa-se que a grande variedade de protocolos, com uso de diferentes medicamentos, potências, frequências e tempo de administração, dificulta a reprodutibilidade da homeopatia na rotina de uma propriedade leiteira.

Há trabalhos que utilizaram bioterápicos, medicamentos feitos a partir de secreções, tecidos ou agentes etiológicos (MITIEDRO, 2002; BARZON et al., 2008) e/ou complexos homeopáticos, formulação com vários medicamentos homeopáticos (VARSHNEY; NARESH, 2005; NÓBREGA et al., 2009; GALDINO, 2009). Porém, o uso

de bioterápicos pré-fabricados a partir dos agentes infecciosos mais envolvidos na mastite é arriscado, pois os microrganismos podem sofrer mudanças facilmente e há grande variabilidade e diversidade de biótipos. Por outro lado, a produção de um auto-bioterápico é demorada, pois é necessário o isolamento dos agentes envolvidos no quadro clínico para posterior preparo do medicamento. Quanto aos complexos homeopáticos, os efeitos causados por vários medicamentos homeopáticos simultaneamente são desconhecidos uma vez que as matérias médicas puras fazem descrições detalhadas somente dos medicamentos dados individualmente (ALMEIDA, 2004; BENITES, 2005).

O uso da homeopatia em animais de produção pode oferecer muitas vantagens, particularmente por seus potenciais efeitos imunoestimulantes, reduzindo a necessidade de tratamentos químicos, mas a documentação desses efeitos ainda é insuficiente (BELLAVITE; ORTOLANI; CONFORTI, 2006).

Continua sendo necessária a realização de mais estudos e pesquisas sobre a utilização da homeopatia para tratamento e prevenção de doenças em animais de produção, como a mastite. Porém, mais importante do que encontrar a fórmula de um único protocolo para tratar a mastite de todo e qualquer rebanho, é a padronização de uma metodologia lógica, eficaz e reproduzível, que permita ao médico veterinário escolher o protocolo homeopático mais adequado para determinado animal ou rebanho.

Além disso, é fundamental que haja diálogo e envolvimento entre a pesquisa veterinária acadêmica e as terapias veterinárias alternativas utilizadas a campo, para a manutenção da saúde e do bem-estar animal (HEKTOEN, 2005).

7 CONCLUSÃO

- Nas condições do rebanho em estudo, os tratamentos homeopáticos utilizados (*Sulphur* 30CH administrado mensalmente e *Calcarea carbonica* 30CH administrada quinzenalmente) não foram eficazes para o tratamento da mastite subclínica, pois de acordo com os parâmetros avaliados, não houve diminuição da celularidade, cura microbiológica ou aumento da produção de leite.
- Os animais do rebanho em estudo apresentaram mastite subclínica com medianas de células polimorfonucleares características de um processo inflamatório agudo.
- Sugere-se que futuros estudos de protocolos homeopáticos para tratamento de mastite subclínica, estabeleçam a administração de medicamentos com frequência superior às realizadas no presente experimento.

REFERÊNCIAS

ACHERMANN, Y.; TRAMPUZ, A.; MORO, F.; WUST, J.; VOGT, M. *Corynebacterium bovis* shoulder prosthetic joint infection: the first reported case. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 213-215, 2009.

ALLEN, T. F. **The encyclopedia of pure materia medica**. Nova Delhi: B. Jain, 2005. 12 vol.

ALMEIDA, A. C.; SOARES, T. M. P.; SILVA, D. B.; SILVEIRA, A. L.; FIORINI, J. E.; FONSECA, Y. M. Eficácia de tratamento homeopático no controle da mastite subclínica em bovinos. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 11, n. 2, p. 53-59, 2005.

ALMEIDA, L. A. B. **Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus***. 2004. 104 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ALMEIDA, L. A. B. **Avaliação de tratamento homeopático com *Phytolacca decandra* 30CH durante a lactação de vacas com mastite subclínica**. 2009. 94 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALVES, A. A. Panorama atual da produção orgânica de leite no Brasil. **Revista Agroecologia Hoje**, v. 29, p. 24-25, 2005.

BARZON, C. D.; MEDEIROS, F.; MORAES, R. E.; SILVA, L. C. M.; MASSAMBANI, C.; TAKEMURA, O. S.; GAZIM, Z. C. Preliminary study of homeopathic treatment of subclinical mastitis evaluated through somatic cells count and California mastitis test. **International Journal High Dilution Research**, v. 7, n. 24, p. 147-151, 2008.

BELLAVITE, P.; ORTOLANI, R.; CONFORTI, A. Immunology and homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. **Advance Access Publication**, v. 3, n. 2, p. 171-186, 2006. Disponível em: <<http://ecam.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 25 mar. 2010.

BENEZ, S. M. **Manual de homeopatia veterinária**. São Paulo: Robe Editorial, 2002. 594p.

BENITES, N. R. **Comparação entre tratamento homeopático de mastite bovina clínica e subclínica**. 2005. 116 p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BENITES, N. R. **Estudo dos aspectos microbiológicos e histopatológicos da mastite infecciosa bovina**. 1996. 169 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

BENITES, N. R. Homeopatia. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 700-708.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Tratamento homeopático de melanoma maligno em cadela. **Cultura Homeopática**, v. 2, n. 5, p. 68-72, 2003.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Features and intensity of inflammatory responses in bovine mammary glands. In: Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland, Stresa, 2000. **Proceedings**. p. 30-35.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de *Prescott & Breed* utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. **Revista Napgama**, v. 4, n. 3, p. 6-9, 2001.

BENTLEY INSTRUMENTS. *Somacount 300*: operator's manual. Chaska, 1995. 12p.

BERNARD, K. A.; MUNRO, C.; WIEBE, D.; ONGSANSOY, E. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4375-4381, 2002.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Veterinary medicine**. 7. ed. London : Baillière Tindall, 1991. p. 501-59.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 116-128, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de Setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado

e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os anexos a esta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2002. Anexo IV, p. 33. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Lei nº 10.831, de 24 de Dezembro de 2003. Dispõe sobre agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 dez. 2003. Sec 1, p. 8. Disponível em: <http://www.prefiraorganicos.com.br/media/5806/lei_n-10831_de_23-12-2003.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 6.323, de 27 de Dezembro de 2007. Regulamenta a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 dez. 2007. Sec 1, p. 2-8. Disponível em: <http://www.prefiraorganicos.com.br/media/5905/decreto_6323_de_27-12-2007.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dez. 2008. Sec 1, p. 21-26. Disponível em: <http://www.prefiraorganicos.com.br/media/5921/instrucao_normativa_n-64-de-dezembro-2008.pdf>. Acesso em 25 mar. 2010.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BURVENICH, C.; MERRIS, V. V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v. 34, p. 521-564, 2003.

CAMPOS, E. P. C. **Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico**. 2004. 58 p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2004.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1934-1943, 2009.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SENA, M. J. Produção higiênica e fatores determinantes da qualidade do leite. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 1, p. 115-134, 1998.

COELHO, V. R. P. **Avaliação de resíduos de antimicrobianos no leite de quartos mamários não tratados de vacas com mastite tratadas por via intramamária.**

Pirassununga, 2003. Dissertação (Mestrado). 102 p. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

COENTRÃO, C. M.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 283-288, 2008.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 443-455.

COSTA, E. O.; MOTA, R.; SANTOS, F. G. B.; MÁRMORE, C.; ARCARO, A.; PERES, A. A. C. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias de fêmeas bovinas em lactação infectadas por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. **Revista Napgama**, v. 8, n. 2, p. 3-7, 2005.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, J. A. B.; GARINO JR, F.; BENITES, N. R., HORIUTI, A. M. Mastite subclínica: prejuízos causados e custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista Napgama**, v. 2, n. 2, p. 16-20, 1999.

CUNHA, M. L. R. S. *Staphylococcus aureus*: toxinas e saúde pública. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007. p. 56-63.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F.; GARCIA, M.; ARAÚJO, W. P. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 8., 2009, Belo Horizonte. **Ciência Animal Brasileira**, suplemento 1, p. 726-731, 2009

DOHOO, I. R.; MEEK, A. H. Somatic cells count in bovine milk. **Canadian Veterinary Journal**, v. 23, n. 4, p. 119-125, 1982.

DULTY, F.; GRUBENMANN, M.; GOLDENBERGER, D. Eye infection in a young patient caused by *Corynebacterium bovis*: microbiological methods and 16s rRNA sequencing. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 26, n. 1, p. 5-7, 2003.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DeGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America: Food animal Practice**, v. 19, p. 109-138, 2003.

FANTI, M. G. N.; ALMEIDA, K. E.; RODRIGUES, A. M.; SILVA, R. C.; FLORENCE, A. C. R.; GIOIELLE, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 259-265, 2008.

FUNKE, G.; GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE III, J. E.; BERNARD, K. A. Clinical Microbiology of Corineform Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 125-159, 1997.

GALDINO, M. C. **Efeito de complexo homeopático no controle e tratamento de mastite em rebanho bovino leiteiro orgânico**. 2009. 60p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2009.

GARINO JR.; COSTA, E. O. Estudo de múltipla resistência "in vitro" de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Revista Napgama**, v. 6, n. 2, p. 11-15, 2003.

GRAPHPAD INSTAT software. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS. 1990-1993.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 25-34, 2002.

HAHNEMANN, S. **Doenças Crônicas**. 5; ed. São Paulo: Grupo de Estudos Homeopáticos de São Paulo "Benoit Mure", 1999.

HAHNEMANN, S. **Exposição da doutrina homeopática ou Organon da arte de curar**. São Paulo: Grupo de Estudos Homeopáticos de São Paulo "Benoit Mure", 1995.

HAHNEMANN, S. **Matéria médica pura**. Curitiba: Editora Gráfica Arins, 1994. 6301p.

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

HEKTOEN, L. Review of the current involvement of homeopathy in veterinary practice and research. **Veterinary Record**, v.157, n. 8, p 224-229, 2005.

HERING, C. **The Guiding Symptoms of our Materia Medica**. Nova Delhi: B. Jain, 1994.

HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M.; HOGVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 113-120, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**, Rio de Janeiro, p. 1-777, 2006. Disponível em:
<<http://www.prefiraorganicos.com.br/agrorganica/producao.aspx> >. Acesso em: 10 jun. 2010.

KENT, J. T. **Repertory of the Homoeopathic Materia Medica**. Nova Delhi: B. Jain, 2006. 1542 p.

KHERLI JR, M. E.; SHUSTER, D. E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.2, p. 619-627, 1994.

KREEGER-VAN-RIG, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 2255 p.

LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual de São Paulo, 2007. p. 08-17.

LANGONI, H.; CABRAL, K. V.; DOMINGUES, P. F.; PULGA, M. E.; MARINHO, M.; PARDO, R. B. Utilização da enrofloxacin (Baytril[®]) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 167-170, 2000.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D. T. P.; GUIMARÃES, F. F.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R. C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 881-886, 2009.

LEITNER, G.; SHOSHANI, E.; KRIFUCKS, O.; CHAFFER, M.; SARAN, A. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 47, n. 8, p. 581-589, 2008.

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HANSLER JR, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1985. 1149 p.

MAGALHÃES, H. R.; FARO, L. E.; CARDOSO, V. L.; PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.

MANGIÉRI JR, R.; SOUTO, L. I. M.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Avaliação de tratamento homeopático na mastite bovina subclínica. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 91-99, 2007.

MITIEDRO, A. M. A. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção**. 2002. 119p. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999.

NADER FILHO, A.; MANGERONA, A. C. S.; MOURA, E. S. Effectiveness of Prevmast[®] in the treatment of subclinical bovine mastitis during the dry period. **Revista Napgama**, v. 5, n. 2, p. 12-14, 2002.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, 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, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

NÓBREGA, D. B.; LANGONI, H.; JOAQUIM, J. G. F.; SILVA, A. V.; FACCIOLI, P. Y.; MATOS, A. V. R.; MENOZZI, B. D. Utilização de composto homeopático no tratamento da

mastite bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 523-537, 2009.

PAAPE, M. J.; BANNERMANN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v. 34, n.5, p. 597-627, 2003.

PAAPE, M. J.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, 2002.

PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n.4, p. 501-510, 1999.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 632-640, 1910.

RAIA, R.B. **Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros**. 2006, 69 p. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006. Doi: 10.1051/vetres:2006007
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2006007>>. Acesso em 24 abr 08.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA, G. H. B., SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M. C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, C; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enteroxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 320-326, 2004.

SAÉNZ, Y.; ZARAZAGA, M.; BRIÑAS, L.; LANTERO, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, n. 4, p. 353-358, 2001.

SAHOTA, A. The Global Market for Organic Food & Drink. In: IFOAM. **The World of organic agriculture: statistics and emerging trends 2010**. Disponível em: <http://www.organic-world.net/fileadmin/documents_organicworld/yearbook/yearbook-2010/sahota-21010-market.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010.

SANDGREN, C. H.; WALLER, K. P.; EMANUELSON, U. Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. **The Veterinary Journal**, v. 175, n.1, p. 108-117, 2008.

SANTOS, M.V; FONSECA, L. F. L.. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri, SP: Manole, 2007. 314 p.

SAXTON, J.; GREGORY, P. **Textbook of veterinary homeopathy**. Oxford: The Alden Press, 2005. 312 p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 139, p. 199-204, 1957.

SEARCY, M. P. V. M.; REYES, O.; GUAJARDO, G. Control of subclinical bovine mastitis - Utilization of a homoeopathic combination. **British Homoeopathic Journal**, v. 84, n.2, p. 67-70, 1995.

SORDILLO, L. M.; DOYMAZ, M. Z.; OLIVER, S. P.; DERMODY, J. T. Leucocytic infiltration of bovine mammary parenchymal tissue in response to *Corynebacterium bovis* colonization. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.4, p.1045-1051, 1989.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

STEINER, R. **A ciência oculta**. 4. ed. São Paulo: Antroposófica, 1998. 320 p.

STÖHR, K.; WEGENER, H. C. Animal use of antimicrobials: impact on resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 4, p. 207-209, 2000.

THIERS, F. O.; BENITES, N. R.; COSTA, E. O. Proporção de Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN) e Mononucleares (MN) no leite comparados aos escores de CMT. **Revista Napgama**, v. 4, n. 4, p. 3-5, 2001.

THIERS, F. O.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; COSTA, E. O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de California Mastitis Test (CMT) no leite de vacas. **Revista Napgama**, v. 2, n. 4, p. 9-12, 1999.

TYLER, M. L. **Retratos de medicamentos homeopáticos**. Santos: Livraria Santos Editora, 1992. v. 2, p. 348-360.

VAZ, A. K. Células somáticas e outros mecanismos de defesa da glândula mamária. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual de São Paulo, 2007. p. 38-44.

VARSHNEY, J. P.; NARESH, R. Comparative efficacy of homeopathic and allopathic systems of medicine in the management of clinical mastitis of Indian dairy cows. **Homeopathy**, v. 94, p. 81-85, 2005.

VICTÓRIA, C.; DA SILVA, A. V.; ELIAS, A. O.; LANGONI, H. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 161-164, 2005.

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

WEIMER, P. J. Microbiology of the dairy animal. In: DEKKER, M. **Applied dairy microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 1-54.

WILLER, H. Organic Agriculture Worldwide: the main results of the FiBL-IFOAM Survey 2010. In: IFOAM. **The world of organic agriculture: statistics and emerging trends 2010**. Disponível em: < <http://www.organic-world.net/2010-biofach-presentations.html#c2253> >. Acesso em: 10 jun. 2010.

YAM, L. T.; LI, C. Y.; CROSBY, W. H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 55, p. 283-289, 1971.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Alterações da composição e da produção de leite oriundo de quartos mamários de vacas

com e sem mastite subclínica de acordo com o estágio e o número de lactações. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 419-426, 2005.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 577-585, 2007.

ZANI, J. L; COSTA, E. O. Avaliação das vias de transmissão de infecção da mastite bovina por *Corynebacterium bovis*. **Revista Napgama**,v. 8, n. 1, p. 18-22, 2005.