



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
**ADIÇÃO DE HOMEOPATIA
NA DIETA DE VACAS
LEITEIRAS: EFEITOS EM
AGENTES ETIOLÓGICOS,
SAÚDE ANIMAL, PRODUÇÃO,
COMPOSIÇÃO E QUALIDADE
DO LEITE**

RENATA CRISTINA DEFILTRO

CHAPECÓ, 2020

RENATA CRISTINA DEFILTRO

**ADIÇÃO DE HOMEOPATIA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS:
EFEITOS EM AGENTES ETIOLÓGICOS, SAÚDE ANIMAL,
PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientadora: Aline Zampar

Co-orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, SC, Brasil

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Defiltro, Renata Cristina

Adição de homeopatia na dieta de vacas leiteiras: efeitos em agentes etiológicos, saúde animal, produção, composição e qualidade do leite / Renata Cristina Defiltro. -- 2020.

56 p.

Orientadora: Aline Zampar

Coorientador: Aleksandro Schafer da Silva

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2020.

1. Contagem bacteriana total. 2. Contagem de células somáticas. 3. Homeopatia. 4. Imunidade. I. Zampar, Aline . II. Silva, Aleksandro Schafer da. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

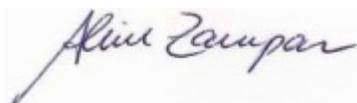
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ADIÇÃO DE HOMEOPATIA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS:
EFEITOS EM AGENTES ETIOLÓGICOS, SAÚDE ANIMAL,
PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE**

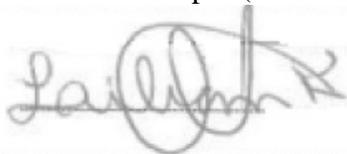
Elaborada por
Renata Cristina Defiltro

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:



Profa. Aline Zampar (UDESC)



Profa. Lilian Kolling Girardini (UNOESC)



Profa. Marta Lisandra do Rêgo Leal (UFSM)

Chapecó, 30 de julho de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde e por sempre abençoar e iluminar o meu caminho e me dar forças para continuar, principalmente nos momentos difíceis.

A minha família, em especial meus pais, minha irmã, meu cunhado e também nosso pequeno Nicolas, que trouxe luz em momentos obscuros, por me incentivarem a, acima de tudo, acreditar em mim mesma, para que eu me mantesse firme nos meus objetivos.

Obrigado por vocês estarem sempre ao meu lado, me ajudar no que for preciso e compreender os momentos de ausência.

Ao meu noivo, por todo companheirismo e paciência de sempre, por me compreender e incentivar a conquistar os meus sonhos. Obrigado por sempre estar ao meu lado.

A Prof^a. Dr^a. Aline Zampar, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva pela coorientação, paciência, compreensão, amizade e por todo o suporte necessário em qualquer dia e horário.

Aos Professores Aline Zampar e Marcelo Vedovatto pela colaboração em análises estatísticas, produção de tabelas e dados para o desenvolvimento da dissertação.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade da realização do Mestrado em Zootecnia. E aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pelos conhecimentos repassados.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pela bolsa de estudos.

A Orgânica Homeopatia Veterinária, pela parceria e suporte financeiro, juntamente a minha colega Patrícia por me ajudar sem medir esforços com as coletas a campo e análises laboratoriais, meu muito obrigado.

Às famílias Zanella e Ansolin por aceitarem o convite e a missão de conduzir o experimento em suas propriedades, pelo auxílio em qualquer dificuldade encontrada durante o período, atenção e acima de tudo o acolhimento. Vocês foram fundamentais para concretizar o objetivo deste trabalho.

Aos meus amigos, e colegas pela ajuda, companheirismo, motivação, conversas e momentos de descontração.

A todos que de alguma forma contribuíram para que essa conquista fosse possível, meu sincero agradecimento.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis”
José de Alencar

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

ADIÇÃO DE HOMEOPATIA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS: EFEITOS EM AGENTES ETIOLÓGICOS, SAÚDE ANIMAL, PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE

AUTORA: Renata Cristina Defiltro

ORIENTADORA: Aline Zampar

Chapecó, 30 de julho de 2020

Mastite é uma doença infecto contagiosa causada por microrganismos diversos; causa prejuízos enormes ao setor produtivo. Também existe uma grande preocupação com uso de produtos químicos no controle dessa doença, pois estes podem deixar resíduo no leite e consequentemente pode contribuir para resistência antimicrobiana por superbactérias. Hoje no mercado existem produtos comerciais alternativos, como homeopáticos ou fitoterápicos, indicados para controlar ou prevenir a mastite, mas cientificamente não é conhecido a eficácia destes. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de um produto homeopático na dieta de vacas leiteiras tem efeitos benéficos sobre a saúde animal e é capaz de melhorar eficiência produtiva, composição e qualidade do leite. O produto testado foi produzido para estimular a imunidade e de forma indireta evitar a colonização da glândula mamária por bactérias e assim diminuir a contagem de células somáticas e bactérias no leite de vacas. Foram utilizadas 50 vacas leiteiras, distribuídas em dois grupos: Controle (n= 25) e Tratado (n= 25). Por 90 dias consecutivos, 50 gramas de produto homeopático (grupo tratado) foi adicionado ao concentrado e como efeito placebo, 50 g do veículo do produto (calcário) foi adicionado ao concentrado das vacas controle. Foram realizadas coletas de leite para análises de composição e qualidade (dias 1, 15, 30, 45, 60, 75 e 90) e coleta de sangue para realizar análises hematológicas e metabolismo (dias 1, 30, 60 e 90). Houve efeito do tratamento com homeopático sobre teor de gordura no leite, isto é, foi maior no leite das vacas do grupo tratado. Consequentemente, devido ao aumento de gordura no leite houve uma tendência de maior teor de sólidos totais. Efeito do tratamento também foi verificado sobre contagem bacteriana total (CBT), com observação de menor CBT no leite de animais tratados. Tendência de efeito do tratamento versus dia foi verificado para contagem de células somáticas (CCS), isto é, menor CCS nos animais que consumiram homeopático nos dias 15 e 30 de experimento. Não foi verificado diferença entre grupos para produção de leite; mas foi verificado uma correlação negativa entre produção de leite versus CBT e CCS no leite das vacas que consumiram produto homeopático. Animais do grupo tratado apresentaram menor contagem de leucócitos total e linfócitos comparado ao controle, assim como tendência de menor contagem de neutrófilos nesses animais. Diversas bactérias foram isoladas no leite das vacas durante o período experimental, sem efeito do tratamento. Entre as bactérias destacamos *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hyicus*; isoladas em maior número de vacas quando comparado aos outros agentes etiológicos. Com base nos resultados concluímos que o consumo do produto homeopático pelas vacas leiteiras teve efeitos positivos sobre qualidade do leite.

Palavras-chave: Contagem bacteriana total. Contagem de células somáticas. Homeopatia Imunidade.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

ADDITION OF HOMEOPATHY IN THE DIET OF DAIRY COWS: EFFECTS ON ETIOLOGICAL AGENTS, ANIMAL HEALTH, MILK PRODUCTION, COMPOSITION AND QUALITY

AUTHOR: Renata Cristina Defiltro

ADVISER: Aline Zampar

Chapecó, 30 julho de 2020

Mastitis is an inflammatory contagious infectious disease caused by several microorganisms; it is responsible for enormous losses in the dairy industry. There is also a great concern surrounding the use of chemicals to control mastitis, because these agents leave residues in milk and consequently can contribute to antimicrobial resistance on the part of “superbugs.” Currently, there are several alternative commercial products, including homeopathic or herbal medicines for the control or prevention of mastitis; nevertheless, their effectiveness is not scientifically established. Therefore, the aim of this study was to determine whether the addition of a homeopathic product to dairy cow feed would improve health and production efficiency, as well as composition and milk quality. The product tested here was produced to stimulate immunity and indirectly to prevent the colonization of the mammary gland by bacteria, thereby decreasing somatic cell counts and bacteria in cow’s milk. Fifty dairy cows were used, divided into two groups: Control (n = 25) and Treated (n = 25). For 90 consecutive days, 50 grams of homeopathic product (treated group) was added to the concentrate; 50 g of the product vehicle (limestone) was added to the concentrate of the control cows. We performed composition and quality analysis on the milk (days 1, 15, 30, 45, 60, 75, and 90) as well as blood collection to carry out hematological and metabolism analyses (days 1, 30, 60, and 90). We found that fat content in the milk cows consuming the homeopathic agent was greater than that of the control group. Because of this increased fat content, there was a tendency towards higher total solids content in treated cows. A treatment effect was found in terms of total bacterial count (TBC); that is, there were lower TBCs in milk of treated animals than in control animals. There was a trend of a treatment effect versus day for somatic cell count (SCC); that is, there were lower SCC in animals that consumed the homeopathic on days 15 and 30 of the experiment. There was no difference between groups in terms of milk production; however, there was a negative correlation between milk production and TBC or SCC in the milk of cows that consumed homeopathic product. Animals in the treated group had lower total leukocyte and lymphocyte counts than did the control group, as well as a tendency toward lower neutrophil counts in these animals. Several bacteria were isolated from the cows' milk during the experimental period, with no treatment effect. In particular, we isolated *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hyicus* in greater numbers of cows compared to other etiologic agents. Based on these results, we conclude that consumption of the homeopathic product by dairy cows had positive effects on milk quality.

Keywords: Immunity. Homeopathy. Somatic cell count. Total bacterial count.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	11
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 PANORAMA DA BOVINOCULTURA DE LEITE	11
1.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE.....	13
1.4 FATORES LIGADOS A QUALIDADE DO LEITE.....	15
1.5 MASTITE	16
1.6 HOMEOPATIA PARA USO EM MASTITE BOVINA.....	18
1.7 OBJETIVO	20
MANUSCRITO	21
2.1 – MANUSCRITO OU ARTIGO I	22
REFERÊNCIAS.....	51

1. CAPÍTULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A atividade leiteira está entre as principais atividades geradoras de renda, principalmente no Oeste de Santa Catarina. Para atender a crescente demanda no fornecimento de matéria prima com qualidade para a industrialização de leite, bem como seus derivados, torna-se imprescindível promover a qualidade desses produtos. Contudo, é preciso ações para garantir a qualidade tais como, nutrição adequada, manejo de ordenha correto, limpeza e adequação dos equipamentos e instalações, para assim, obter a produtividade desejada e manter o bem-estar dos animais.

O setor lácteo em Santa Catarina é composto por importantes laticínios distribuídos por toda a extensão do estado, principalmente na região Oeste, que buscam matéria prima de qualidade e com características tecnológicas importantes para o processamento de derivados lácteos, principalmente para a fabricação de queijos.

Devido a isso, as empresas e os próprios produtores rurais buscam opções para promover melhorias na produção leiteira, entre elas, a homeopatia. Esta tem o objetivo de reduzir a contagem de células somáticas do leite (CCS) ou diminuir problemas como estresse e baixa imunidade que é causada aos animais devido à produtividade maior que se busca (MONCAYO, 2000). Adicionalmente, a homeopatia pode diminuir custos de produção, pois não se faz necessário descartar leite, economiza-se com gastos com antibióticos e até mesmo evitar o descarte precoce do animal na propriedade (SANTOS e FONSECA, 2007).

Com isso, esse trabalho busca avaliar o uso da homeopatia no tratamento de mastite subclínica em rebanhos no oeste de Santa Catarina, através dos resultados de CCS, contagem bacteriana total (CBT) e os constituintes do leite e análises bioquímicas do sangue e hematológicas dos animais.

1.2 PANORAMA DA BOVINOCULTURA DE LEITE

A bovinocultura de leite está em constante crescimento no mundo, sendo considerada uma atividade de grande interesse econômico, pois gera inúmeros empregos diretos e

indiretos. Segundo a EMBRAPA (2020), a produção mundial de leite de vaca em 2018 foi de aproximadamente 682 milhões de toneladas. O Brasil ocupou o 3º lugar no ranking mundial de produção em 2018, com 33,8 milhões de toneladas de leite, proveniente de 16 milhões de vacas ordenhadas (EMBRAPA, 2020). O país fica atrás somente da Índia com 89,8 milhões de toneladas e dos Estados Unidos que lidera o ranking com 98,6 milhões de toneladas produzidas em 2018.

De acordo com o IBGE (2018), o Brasil apresenta uma área territorial de 8.510.820,623 km² e, portanto, alta capacidade de produção. O país é subdividido em cinco grandes regiões, as quais apresentam particularidades ambientais e climáticas. Cerca de 7% do território nacional é ocupado pela região Sul, que compreende os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (IBGE, 2018).

A produtividade média de leite no Brasil foi de 2.069 litros/vaca/ano em 2018, no entanto, os estados do Sul apresentam melhores produções que a média nacional, ocupam as três primeiras posições, Santa Catarina obteve o melhor indicador (3.799 litros/vaca/ano), seguido pelo Rio Grande do Sul (3.441 litros/vaca/ano) e em terceiro Paraná (3.225 litros/vaca/ano) (EMBRAPA, 2020). A região Sul em 2018 foi a maior produtora de leite, com 11,588 bilhões de litros produzidos (34% da produção total), e a região Sudeste em segunda colocação com 11,465 bilhões de litros (EMBRAPA, 2020). Ao comparar o número de animais ordenhados entre as duas regiões, o Sul possui um rebanho de 3.371.200 milhões de animais, aproximadamente 29,36% menor que a região Sudeste, na qual, possui 4.772.231 milhões de vacas ordenhadas (EMBRAPA, 2020). Diante disso, percebe-se que dentro do Brasil, a produção de leite é diversificada, assim como acontece com os tipos de clima e vegetação, e por isso não há um padrão de produção e nem um sistema específico. Segundo Assis et al. (2005), o Brasil possui grande diversidade de sistemas de produção de leite e a caracterização destes é importante para identificar os gargalos do setor e implementar projetos que promovam o desenvolvimento regional.

Entre os principais fatores que interferem na diversificação da produção estão a sazonalidade do clima, os índices de luminosidade, umidade e temperatura, a imensa diversidade natural possibilita a produção de leite a pasto, com pastagens de boa qualidade e adaptada a cada região, nessa condição, permite garantir a quantidade e a qualidade de leite produzido, com custo mais baixo (SILVA et al., 2008). Isso é importante principalmente para

aos pequenos produtores que tem a atividade leiteira como principal fonte de renda e conseguem produzir leite de qualidade com menor custo de produção.

Santa Catarina é o quinto maior produtor de leite do Brasil, com aproximadamente 3 bilhões de litros, destes, a região Oeste se destaca com aproximadamente 2,3 bilhões de litros produzidos em 2018 (EMBRAPA, 2020). Estes resultados mostram que o setor leiteiro tem um grande potencial econômico e contribuem significativamente para a geração de renda aos produtores, principalmente na região oeste do estado.

Além do volume, a produtividade também tem aumentado em âmbito nacional, porém os índices são muito menores se comparados com outros países, e precisam ser melhorados, como por exemplo, os EUA onde a produtividade média anual foi 10.463 litros por vaca em 2018 (EMBRAPA, 2020). Este índice evidencia que a produção de leite brasileira é baixa em relação ao rebanho existente. Diante disso, o sistema de produção como um todo precisa ser melhorado para se obter melhores índices de produtividade, na busca de tornar os animais mais eficientes, através do bom gerenciamento da propriedade, estratégias nutricionais que atendam a exigência dos rebanhos, seleção genética e sanidade dos animais.

1.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE

O leite e seus derivados são fundamentais para a saúde humana, pois estes alimentos possuem alto valor biológico e são fonte de proteínas, vitaminas e minerais, principalmente de cálcio, magnésio e potássio (WEAVER, 2009). O autor ainda complementa que o consumo destes produtos está ligado à prevenção de distúrbios como osteoporose, hipertensão, prevenção de diabetes e acidentes vasculares cerebrais e cardiovasculares. Além de ser importante fonte de fornecimento de aminoácidos essenciais para produzir proteínas no organismo (KANWAR et al., 2009).

Aproximadamente 87% da composição do leite é água, 13% sólidos, sendo representados por 3,9% de lipídios, 3,4% proteínas, 4,8% lactose e 0,8% de vitaminas e minerais (REIS et al., 2012). A porcentagem de sólidos totais que é composta pelos percentuais de gordura, da lactose e da proteína presentes no leite deve ser de no mínimo 11,4%, segundo a Instrução Normativa nº 76 (BRASIL, 2018). Estes elementos são importantes, pois promovem o rendimento, principalmente quando se trata da fabricação de

derivados lácteos (BUITENHUIS et al., 2016). Esses componentes podem ser manipulados pela genética e ambiente (BITTANTE et al., 2014), e isso retrata a importância que o produtor rural deve ter quanto ao manejo nutricional e sanitário adequado dos animais, pois estes fatores podem refletir na qualidade do leite, que é requerida pelos laticínios.

De acordo com Santos e Rodrigues (2013) as proteínas são divididas em duas frações, sendo representadas por quatro tipos de caseína (α -S1, α -S2, β e κ) que correspondem a cerca de 80% da proteína total do leite e o restante constitui o soro do leite (α lactoglobulina e β -lactoglobulina). Mas alguns fatores podem interferir nesse perfil proteico como a raça dos animais, idade, estágio de lactação, nutrição e nível de produção, pois, animais com menor produção de leite, tendem a compensar na maior composição de sólidos (STOCCO et al., 2017).

As lactoglobulinas estão entre as principais proteínas encontradas no soro do leite, participam de importantes reações metabólicas no organismo, como na digestão dos lipídios do leite durante o período de crescimento dos mamíferos (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011), carreador de ácidos graxos e triglicérides (PÉREZ et al., 1992), transferência de imunidade passiva (SUTTON & ALSTON-MILS, 2006) e síntese de lactose (MARKUS et al., 2002).

A lactose é o principal açúcar presente no leite. Este componente está positivamente associado ao crescimento e pode ajudar no tratamento e prevenção da subnutrição. No entanto, há preocupação quanto à condição de intolerância à lactose que acontece em algumas pessoas (MICHAELSEN et al., 2011), e está relacionada à má função da lactase, que é a enzima responsável pela quebra da lactose, devido a isso ocorre a má absorção da mesma e gera casos de diarreia nos humanos (VANDENPLAS, 2015).

Para Beloti (2015), a gordura é o componente que mais varia no leite, tanto entre espécies quanto dentro da mesma espécie, dependendo da raça, por exemplo, nos bovinos as vacas jersey produzem maiores teores de gordura se comparado às vacas holandesas. A gordura contribui positivamente para as características organolépticas dos subprodutos, tais como, textura, sabor e aparência, e serve como fonte de energia e ácidos graxos essenciais (como o ácido linoleico), além de atuar como transportadora de vitaminas lipossolúveis (A, D e E) (KANWAR et al., 2009).

1.4 FATORES LIGADOS A QUALIDADE DO LEITE

No Brasil existe uma legislação que trata dos parâmetros mínimos exigidos em relação à qualidade do leite, com o objetivo de garantir e melhorar a qualidade dos produtos lácteos. De acordo com a instrução normativa nº 76 (IN 76/2018) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os parâmetros de qualidade para produção do leite que, dentre as várias exigências, há valores recomendados de CCS, CBT, gordura, proteína e sólidos totais, em seu artigo 7º o leite cru refrigerado de tanque individual deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas de no máximo 300.000 UFC/mL (trezentas mil unidades formadoras de colônia por mililitro de leite) e de Contagem de Células Somáticas de no máximo 500.000 CS/mL (quinhentas mil células por mililitro de leite), além disso, a instrução normativa recomenda como o teor mínimo de gordura de 3,0g/100g e de proteína 2,9g/100g, e o teor mínimo de 11,4g/100g de sólidos totais do leite (BRASIL, 2018).

A qualidade em seus parâmetros ideais é indispensável para a industrialização do leite fluido na produção de derivados lácteos e a exigência do consumidor por um produto que atenda suas expectativas de qualidade, principalmente nos aspectos organolépticos, sabor e odor, por exemplo, além de segurança alimentar. A indústria que coleta o leite nas propriedades para obter produto de qualidade impõe parâmetros mínimos que estão descritos na IN 76, mas ainda existem propriedades que não estão adequadas a esses parâmetros das instruções normativas atuais e podem sofrer com penalizações em sistemas de pagamentos por qualidade.

A CCS na espécie bovina é usada como um dos importantes parâmetros de verificação da sanidade do rebanho, que compreende além de células de descamação do epitélio mamário, as células de defesa (leucócitos) que se deslocam até a glândula mamária a fim de combater os agentes causadores da mastite, que podem variar de acordo com o animal, genética, ambiente e o manejo (WINDIG et al., 2005). Além disso, serve como medida para prevenção e controle de mastite, usada como ferramenta importante para o controle de perdas da produção do rebanho (WINDIG et al., 2005). Estudos verificaram que vacas sadias apresentam CCS entre 50.000 a 200.000 células/mL de leite, acima disso, é considerada mastite subclínica (LANGONI, 2000).

A CBT, contagem padrão em placas (CPP), expressa em UFC/mL estima a contaminação do leite por microrganismos após a saída do teto, sendo considerado um indicador de higiene, tanto no que diz respeito à obtenção do produto quanto ao transporte e armazenamento. A glândula mamária, equipamentos e utensílios de ordenha, qualidade da água e exterior do úbere são exemplos que podem causar contaminação no leite (PORTES, NETO & SOUZA, 2012).

A nutrição dos animais é um dos principais fatores responsáveis pelas modificações qualitativas do leite, principalmente pelo alto potencial de mudanças nas concentrações de gordura e os perfis de ácidos graxos do leite (VICENTE et al., 2017), diferentemente da proteína e lactose, que possuem menor sensibilidade à manipulação dietética do animal (JENKINS & MCGUIERE, 2006). Por outro lado, a maior proporção de concentrado em relação ao volumoso pode promover maior produção de teor de proteína no leite em relação à gordura (JENKINS & MCGUIERE, 2006), fato este que ressalta a nutrição como fator de alteração na composição do leite, através do maior fornecimento de forragens ou alimento concentrado.

1.5 MASTITE

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, está entre as principais doenças que afeta a saúde da vaca, tem efeitos prejudiciais nos animais e em seu bem-estar, o que interfere na rentabilidade e representa 30% dos problemas de saúde em vacas leiteiras (FOURICHON et al., 2001). É causada, na maioria das vezes, por bactérias que colonizam os tetos e úbere do animal e faz com que aumente o número de células de defesa na tentativa de eliminar os patógenos causadores e com isso ocorre aumento na contagem de células somáticas (CCS), mudanças na qualidade do leite e cor, nódulos, coágulos sanguíneos e modificam o estado de saúde do animal (KIRSANOVA, 2019). O leite é um excelente meio de cultura para alguns microrganismos devido ao seu pH próximo à neutralidade, somado a alta concentração de açúcares e proteínas (ZECCONI e HAHN, 2000). Se a mastite não for tratada, além de reduzir a quantidade e a qualidade do leite produzido pelo animal, pode levar ao descarte precoce das vacas em produção ou, ainda, em casos extremos de maior gravidade, à morte (DOEHRING & SUNDRUM, 2019).

A mastite pode ser clínica ou subclínica, a primeira é frequentemente associada a sinais clínicos no animal, como febre, úbere doloroso, avermelhado, duro e inchado, acompanhado de mudanças na aparência do leite, como presença de grumos, pus e sangue (DE VLIEGHER et al., 2012). A mastite subclínica é mais difícil de reconhecer, mas, prejudica a saúde do animal, gera perdas em longo prazo que acarretam prejuízos na produção, exige maior mão de obra na propriedade, custo com tratamento e descarte de leite durante o tratamento tradicional com alopáticos, diminuição da imunidade do animal e consequente, perdas reprodutivas. Apesar de não haver mudanças visíveis na aparência do leite, estado de saúde ou aparência externa do úbere, mudanças internas ocorrem, como diminuição da produção de leite, bactérias presentes, aumento de CCS e a composição do leite é alterada (AUBRY, et al., 2013).

Nas infecções crônicas ou subclínicas de mastite os sinais clínicos não são visíveis e afetam 10 a 15% das vacas em lactação. O diagnóstico pode ser obtido por testes indiretos que se baseiam na quantidade de CCS presente na amostra de leite do animal, podendo esta avaliação ser realizada em laboratório (SCHERPENZEEL et al., 2014) ou por testes rápidos a campo como o *California Mastitis Test* (CMT), popularmente chamado de teste da raquete (SCHALM & NOORLANDER, 1957).

É importante destacar que a mastite subclínica apresenta maior prevalência (95%) em relação à mastite clínica. Embora muitas vezes negligenciada pelos produtores, a CCS é uma importante ferramenta de avaliação da qualidade do leite e indicativo de mastite subclínica (SANTOS e FONSECA, 2007). Segundo AUBRY et al. (2013) para cada caso de mastite clínica, há 20 a 40 vezes mais casos de mastite subclínica.

Dentre as bactérias que podem causar mastite, as principais são o *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, além de agentes não bacterianos, tais como fungos e até mesmo microalgas. Dentre os principais agentes, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, pela alta prevalência e prejuízos que acarreta (ZECCONI e HAHN, 2000; LANGONI et al., 2011). *Staphylococcus aureus*, além de ser resistente a tratamentos com medicamentos alopáticos, ainda é motivo de preocupação da indústria alimentícia, pois produz a enterotoxina estafilocócica, capaz de causar intoxicação alimentar (TEIXEIRA et. al., 2008).

O tratamento da mastite envolve tipicamente o uso de antibióticos e, em casos graves, terapia de suporte adicional, como fluídos intravenosos e analgésicos. Contudo, o uso repetido de antibióticos para o tratamento da mastite pode levar ao surgimento de resistência bacteriana, por isso a importância de utilizar produtos alternativos para diminuir essas consequências e aumentar os benefícios para o animal e sua produção (AUBRY et al., 2013).

Nas propriedades, a resistência a antibióticos gera aumento no custo de produção devido à necessidade de usar mais drogas no objetivo de atingir a cura do animal e pelo tempo em que o leite ordenhado de um animal tratado deixa de ser comercializado (SCHROEDER, 2012). Devido a isso, a utilização de testes de avaliação da suscetibilidade são importantes, para buscar um produto que seja eficaz *in vitro*. Além disso, avaliar o agente isolado para avaliar se é válido investir no tratamento.

A investigação do desfecho em casos de mastite não tratados com drogas alopáticas é de interesse devido aos esforços para diminuir a utilização de medicamentos antibacterianos na produção de leite, pois animais submetidos a tratamento com antibióticos devem ter o leite descartado e obedecer o período de carência para captação do leite após o tratamento (STEVENS et al, 2016).

1.6 HOMEOPATIA PARA USO EM MASTITE BOVINA

A homeopatia é uma forma de terapia que tem como princípio “semelhante cura semelhante”, aquele que provoca a doença, também provoca a cura. O termo Homeopatia deriva dos radicais *homeos*: semelhante e *pathos*: moléstia. Essa técnica surgiu em 1796 com o médico alemão Samuel Hahnemann, que insatisfeito com sua profissão decidiu abandonar a medicina oficial e descobriu em seus estudos que o semelhante cura o semelhante, dando assim origem à primeira lei do tratamento, depois desenvolveu as demais leis que são experimentação nos seres sadios e medicamento único e dose mínima (VITHOULKAS, 1980; DUDGEON, 1994; BATELLO, 1994).

A homeopatia pode ser utilizada de maneira individualizada para a cura do indivíduo, através de um medicamento único; medicamento focado nos sintomas da doença; os dois simultaneamente ou, ainda, o uso de nosódios, que são medicamentos preparados a partir de substâncias patogênicas de origem vegetal ou animal (VITHOULKAS, 1980; CARNEIRO,

2011, TEIXEIRA, 2015). Objetiva manter a energia vital do indivíduo em equilíbrio, e isto o mantém saudável, ao contrário, quando está em desequilíbrio, o organismo se torna enfermo ou sujeito a enfermidades (POITEVIN, 2019). A homeopatia Hahnemanniana baseia-se no tratamento do indivíduo com um único medicamento homeopático (Simillimum) capaz de equilibrar e curar o indivíduo em sua totalidade (VITHOULKAS, 1980, HAHNEMANN, 1996).

Os remédios homeopáticos são oriundos de plantas, minerais ou de origem animal, e são geralmente dados aos pacientes em altas diluições. Essas diluições são reivindicadas para serem ativadas através de uma diluição especial e do processo de agitação chamado potenciação, porém, seu uso faz da homeopatia uma questão muito controversa para a ciência animal (VICKERS, 2000). Devido à abordagem de tratamento individualizada utilizada em homeopatia clássica, a disponibilidade de informações individuais do indivíduo paciente e o processo da doença são importantes. A disponibilidade dessas informações é geralmente boa para vacas leiteiras, em comparação com outros animais de criação, pois o contato diário do produtor com o animal permite que seja observado o estado de saúde do animal, o que auxilia na identificação de animais com mastite, que é uma doença crítica na produção leiteira e conhecida por ser prevenida e alguns casos tratada com homeopatia (HENRIKSEN, 2002; MERCK et al., 1989; SEARCY, REYES & GUAJARDO, 1995; SPRANGER, 1998). Esses aspectos propõem que a mastite subclínica em vacas leiteiras é adequada em tratamento homeopático individualizado, e sua investigação também é de relevância prática (HEKTOEN et al., 2004).

O uso de tratamentos alternativos ao uso de medicamentos alopáticos está em expansão em humanos (BERGQUIST, 2018; EISENBERG et al., 1998; FISHER & WARD, 1994; KESSLER et al., 2001), mas informações sobre o uso em medicina animal é limitado, pois ainda são poucos os estudos com bons registros. No tratamento de animais de produção, as terapias alternativas estão relacionadas à agricultura orgânica, devido à ênfase dada a métodos naturais e medicamentos nos padrões orgânicos e a intenção geral de reduzir o uso de substâncias químicas indiscriminadamente (CEC, 1991; IFOAM, 2014). Uma pesquisa norueguesa concluiu que pelo menos 15% dos agricultores orgânicos noruegueses utilizam a homeopatia como parte de sua gestão para controle da saúde em seu rebanho de ovinos de leite (HENRIKSEN, 2002). Estudos em outros países também encontraram que esse uso está

se expandindo (HOVI & RODERICK, 2000; KRUTZINNA, BOEHNCKE & HERRMANN, 1996; WELLER & BOWLING, 2000). Hovi e Roderick (2000) salientaram que a homeopatia é mais usada em fazendas orgânicas do que fazendas convencionais, mas o uso de homeopatia fora da agricultura orgânica, geralmente, ainda é pouco estudado.

A homeopatia é um produto com componentes naturais para estimular as defesas do corpo do animal. Seu uso em casos de mastite traz benefícios aos animais produtores de alimentos e reduz o resíduo de antibiótico no leite, assim, possui um papel importante na produção sustentável de alimentos com qualidade (CHANDEL et al., 2009). É importante esclarecer que o processo de cura através da homeopatia é diferente do convencional e, portanto, resultados como aumento nos valores de CCS em vacas de leite nos primeiros meses de uso dos medicamentos homeopáticos, são comuns e até esperados, em função da reação do organismo que antecede a cura (MITIDIERO, 2002)

Como alternativa no tratamento de mastites nas vacas leiteiras, o uso da homeopatia somado ao bom manejo na propriedade, possibilita que o produtor forneça à indústria um leite de melhor qualidade e que seja produzido a um custo menor por litro (SEEGERS et al., 2003; VARSHNEY e NARESH, 2005).

1.7 OBJETIVO

Avaliar se a adição de um produto homeopático na dieta de vacas leiteiras tem efeitos em casos de mastite subclínica, benefícios sobre a saúde animal, eficiência produtiva, composição e qualidade do leite.

2 - CAPÍTULO II
MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com suas formatações de acordo com as orientações da revista científica:

Microbial Pathogenesis

2.1 – MANUSCRITO OU ARTIGO I

Addition of a homeopathic, preventive product for mastitis in dairy cow feed: effects on etiologic agents, animal health, production, composition, and quality of milk

Renata Cristina Defiltro, Patrícia Glombowsky, Lilian Kolling Girardini, Julcimar M. Maciel
Marcelo Vedovatto, Aleksandro Schafer Da Silva, Aline Zampar

De acordo com normas para publicação em:

Microbial Pathogenesis

1 **Addition of a homeopathic, preventive product for mastitis in dairy cow feed: effects on**
2 **etiologic agents, animal health, production, composition, and quality of milk**

3

4 Renata Cristina Defiltro^{1*}, Patrícia Glombowsky¹, Lilian Kolling Girardini², Julcimar M.
5 Maciel², Marcelo Vedovatto³, Aleksandro Schafer Da Silva^{4*}, Aline Zampar^{4*}

6

7 1. Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina
8 (UDESC), Chapecó, Brasil.

9 2. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Oeste de Santa Catarina, Xanxerê,
10 SC, Brasil.

11 3. Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.

12 4. Departamento de Zootecnia, UDESC, Chapecó, SC, Brasil

13

14 *Correspondence author: renatadefiltro@gmail.com; aleksandro_ss@yahoo.com.br;
15 aline.zampar@udesc.br

16

17 Abstract

18 Mastitis is an inflammatory contagious infectious disease caused by several microorganisms;
19 it is responsible for enormous losses in the dairy industry. There is also a great concern
20 surrounding the use of chemicals to control mastitis, because these agents leave residues in
21 milk and consequently can contribute to antimicrobial resistance on the part of “superbugs.”
22 Currently, there are several alternative commercial products, including homeopathic or
23 herbal medicines for the control or prevention of mastitis; nevertheless, their effectiveness is
24 not scientifically established. Therefore, the aim of this study was to determine whether the
25 addition of a homeopathic product to dairy cow feed would improve health and production
26 efficiency, as well as composition and quality of milk. The product tested here was produced
27 to stimulate immunity and indirectly to prevent the colonization of the mammary gland by
28 bacteria, thereby decreasing somatic cell counts and bacteria in cow’s milk. Fifty dairy cows
29 were used, divided into two groups: Control (n = 25) and Treated (n = 25). For 90
30 consecutive days, 50 grams of homeopathic product (treated group) was added to the
31 concentrate; 50 g of the product vehicle (limestone) was added to the concentrate of the
32 control cows. We performed composition and quality analysis on the milk (days 1, 15, 30,
33 45, 60, 75, and 90) as well as blood collection to carry out hematological and metabolism
34 analyses (days 1, 30, 60, and 90). We found that fat content in the milk cows consuming the
35 homeopathic agent was greater than that of the control group. Because of this increased fat
36 content, there was a tendency towards higher total solids content in treated cows. A treatment
37 effect was found in terms of total bacterial count (TBC); that is, there were lower TBCs in
38 milk of treated animals than in control animals. There was a trend of a treatment effect versus
39 day for somatic cell count (SCC); that is, there were lower SCC in animals that consumed the
40 homeopathic on days 15 and 30 of the experiment. There was no difference between groups
41 in terms of milk production; however, there was a negative correlation between milk
42 production and TBC or SCC in the milk of cows that consumed homeopathic product.
43 Animals in the treated group had lower total leukocyte and lymphocyte counts than did the
44 control group, as well as a tendency toward lower neutrophil counts in these animals. Several
45 bacteria were isolated from the cows' milk during the experimental period, with no treatment
46 effect. In particular, we isolated *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*,
47 *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hyicus* in greater numbers of cows compared

48 to other etiologic agents. Based on these results, we conclude that consumption of the
49 homeopathic product by dairy cows had positive effects on milk quality.

50 **Keywords:** Immunity. Homeopathy. Somatic cell count. Total bacterial count.

51

52 **Introduction**

53 Subclinical mastitis, one of the most common problems in dairy production, is
54 characterized by inflammation usually an infectious character. Mastitis causes a drop in milk
55 quality and a decrease in herd productivity [1]. Despite several options for allopathic
56 treatment of mastitis, most are costly, and many, in turn, leave residues in the milk, making it
57 necessary to discard the milk during the treatment period [2]. Furthermore, the indiscriminate
58 and inappropriate use of antibiotics may be related to the emergence of multidrug-resistant
59 bacteria [3]. For these reasons, newer less aggressive treatment options are sought, mainly for
60 the production of organic milk [4]. Among these options, homeopathy has gained ground in
61 conventional and organic systems because homeopathic products used as preventives do not
62 require disposal of milk [5]. Studies report the use of homeopathic products for the treatment
63 of mastitis [6,7,8], nevertheless, it remains unknown scientifically as to whether these
64 products effectively prevent control mastitis.

65 Homeopathic companies have generated several products, including some indicated
66 for mastitis control; these companies have grown economically, because rural producers have
67 bought these products to improve production and milk quality. Most homeopathic products
68 are intended to stimulate immunity and thereby to prevent and control subclinical mastitis,
69 consequently improving milk quality by reducing somatic cell counts (SCC) and total
70 bacterial count (TBC) [9]. Stress and low immunity are common situations in high-yielding
71 dairy cows [10] that are expected to diminish with daily consumption of homeopathic
72 product. Homeopathic product sales sector reports indicate that these products can decrease
73 production costs, reducing cases of mastitis in herds and thereby decreasing treatment costs,
74 discarding of milk and early disposal of the animal; furthermore, they are less costly than
75 allopathic treatments [11].

76 The financial growth of the homeopathic pharmaceutical industry has been enormous,
77 with several positive reports from producers; nevertheless, scientifically, the evidence
78 remains limited. Therefore, the objective of this study was to determine whether the addition

79 of a homeopathic product to dairy cow feed would improve health as well as production
80 efficiency, composition, and quality of milk.

81

82 **2. Materials and Methods**

83 2. 1. Homeopathic product

84 We used a homeopathic product indicated to prevent mastitis in dairy cows, in
85 addition to improving the quality of milk (Estimulac H®, Organic Veterinary Homeopathy,
86 Chapecó, SC, Brazil). The formulation of this product, prepared according to the
87 Hahnemannian method (CH), includes *Staphilococcinum* (14CH), *Colibacillinum* (30CH),
88 *Streptococcinum* (14CH), *Bryonia alba* (14CH), *Silicea terra* (200CH), *Phytolacca* (14CH),
89 and *Carbonic limestone* (14CH). The product was designed for daily consumption of 50 to
90 100 grams per animal.

91

92 2.2. Animals

93 We used 50 Holstein (n = 26), Jersey (n = 10) and crossbred (n = 14) dairy cows from
94 two private properties located in the municipalities of Coronel Freitas and Xaxim in the state
95 of Santa Catarina, Brazil. The two farms were chosen because they agreed to participate in
96 the study and had histories of elevated SCC in milk.

97 The animals used differed in terms of ages, numbers of lactations, body weight and
98 stages of lactation (1st and 2nd third of lactation). All animals were in the lactation phase and
99 were apparently healthy.

100 In one of the properties, identified as "A," 33 cows were selected; they were confined
101 to the same compost barn shed. These animals received a diet based on silage, hay and
102 concentrate (Supplementary Table 1) during the experimental period.

103 The other property, identified as "B," adopted a semi-extensive system, with animals
104 fed on pasture of perennial grasses, African star, and Jiggs during the day, and silage and
105 concentrate in the feeder after morning and afternoon milking. On this property, we selected
106 17 lactating cows, all of whom were healthy.

107 During the experiment (beginning, middle, and end), we collected samples of feed
108 consumed by the cows on both farms. The samples were frozen and analyzed separately at
109 the end of the experiment in a specialized laboratory. The bromatological analyses (dry

110 matter, crude protein, ether extract, crude fiber, neutral detergent fiber (NDF), and acid
111 detergent fiber (FDA)) of food was performed using the NIRS method (FOSS DS 2500). The
112 results of the chemical composition of the food are presented in Supplementary Table 1.

113

114 2.3. Experimental design

115 Two groups of 25 cows each were formed, identified as control and treated. For the
116 formation of homogeneous groups, we distributed the cows according to the following
117 criteria: a) by property (farm A - 16 control and 17 treated; farm B - 9 control and 8 treated);
118 b) breed (Holstein, Jersey, and Mixed); c) lactation phase (1st or 2nd third of lactation); and d)
119 age.

120 The cows in the treated group consumed a daily dose of 50 grams of powdered
121 homeopathic product per cow mixed with the concentrate, divided twice a day (07:00 AM
122 and 06:00 PM) individually. The control group consumed the vehicle used to formulate the
123 homeopathic in the same amount (50 g), that is, limestone. The experiment lasted 90 days,
124 and the treatment was carried out during this experimental period.

125

126 2.4. Measurement of milk

127 Milk was measured on days 1, 15, 30, 45, 60, 75, and 90 of the experiment, using
128 meters coupled to the milking system (model Milk Meter), in which it was possible to
129 measure the production of animals in kg of milk/cow/day.

130

131 2.5. Sample collection

132 For the microbiological culture analysis, milk samples were collected on days 1, 30,
133 60, and 90 of the experiment into sterile bottles, after cleaning the teat, washing with running
134 water, drying with disposable paper towels and using alcohol solution iodinated to 5%, for
135 disinfection of the teat orifice. After the first three jets of milk were discarded, 10 mL of milk
136 was collected for microbiological examination. The samples were transported frozen in an
137 isothermal box with recyclable ice to the laboratory of the University of the West of Santa
138 Catarina (UNOESC), where the analyses were carried out on an outsourced basis [12].

139 For analysis of milk composition and quality, we used a homogeneous sampling of
140 the morning milking stored in the milk meter during the measurement of the volume of milk

141 produced. The sample contained 50 mL of milk from each cow, allocated in specific bottles
142 with two preservative tablets (Bronopol®). The samples were stored at 10 °C and sent to the
143 Centralized Laboratory for Milk Analysis of the Paraná Herd Analysis Program (PARLPR -
144 APCBRH) in Curitiba-PR, Brazil. This laboratory is accredited by the Ministry of
145 Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) and is part of the Brazilian Milk Quality
146 Network (RBQL).

147 Blood samples were collected on days 1, 30, 60, and 90 of the experiment, drawn
148 from the caudal vein with needles and vacuum tubes. For hematological analysis, blood
149 samples were collected in tubes with anticoagulants (EDTA); for biochemical analyses, we
150 used tubes without anticoagulant. All blood samples were stored in isothermal boxes with
151 ice, maintained at 10 °C during transport to the laboratory where the samples from tubes
152 without anticoagulant were subjected to centrifugation (3400 g for 10 minutes) to obtain the
153 serum, and were stored at -20 °C.

154

155 2.6. Laboratory analysis

156 2.6.1. Centesimal composition of milk

157 Fat, protein, lactose, total solids, and urea were measured in raw milk using the
158 medium infrared spectrometry method [13].

159

160 2.6.2. Somatic cell count and total bacterial count

161 The flow cytometry method was used to obtain somatic cell counts [14] and total
162 bacterial counts [15,16]. Both analyses were accredited by the Ministry of Agriculture,
163 Livestock and Supply (MAPA) and by the National Institute of Metrology, Quality and
164 Technology (Inmetro).

165

166 2.6.3. Microbiological culture

167 The samples were cultured on blood agar supplemented with 5% defibrinated sheep
168 blood, MacConkey agar and Sabouraud agar. A 10 µl volume of milk was inoculated into
169 each culture medium and the plates were incubated at 37 °C for 24–72 hours. The
170 microorganisms that grew on the plates were identified according to the morpho-dye
171 characteristics and methodologies described by [12,17].

172

173 2.6.4. Hemogram

174 The blood count was performed within 2 hours after sample collection, with the count
175 of erythrocytes, total leukocytes, and hemoglobin using a semiautomatic blood cell counter
176 (model CELM CC530). Hematocrit was measured using capillary tubes, centrifuged for 1
177 minute at 14,000 rpm. The leukocyte differential was performed through evaluations of blood
178 smear stained using *Panotico Rapido* kits.

179

180 2.6.5. Serum biochemistries

181 Serum levels of total protein, albumin, triglycerides, cholesterol, and glucose were
182 measured using a semi-automatic analyzer (BioPlus 2000®) with commercial kits (Analisa®,
183 Brazil), following the manufacturer's recommendations. Globulin levels were obtained by
184 subtracting albumin from total protein (globulin = total protein – albumin).

185

186 2.7. *Statistical analysis*

187 Each animal was considered the experimental unit for all analyses. All dependent
188 variables were tested for normality using the Univariate procedure of SAS (SAS Inst. Inc.,
189 Cary, NC, USA; version 9.4) and log-transformed (SCC and TBC) when needed. Then, all
190 data were analyzed using the MIXED procedure of SAS, with the Satterthwaite
191 approximation to determine the denominator degrees of freedom for the test of fixed effects.
192 All variables were analyzed as repeated measures and tested for fixed effects of treatment,
193 day, and treatment × day, using animal (treatment) and farm as random variables. All results
194 obtained on d 1 for each variable, days in milk and number of calving of each cow were
195 included as covariates, but were removed from the model when $P > 0.10$. The compound
196 symmetric covariance structure was selected for milk production and milk concentration of
197 protein; the Toeplitz covariance structure was selected for serum concentration of glucose
198 and hematocrit, neutrophils, and eosinophils; and the first order autoregressive covariance
199 structure was selected for all other variables. The covariance structures were selected
200 according to the lowest Akaike information criterion. A simple Pearson correlation was
201 evaluated among the variables using CORR procedure of SAS to determine the interrelation
202 between these. Means were separated using PDIFF and all results were reported as

203 LSMEANS followed by SEM. Significance was defined when $P \leq 0.05$, and tendency when P
204 > 0.05 and ≤ 0.10 .

205

206 **3. Results**

207 3.1. Milk production and composition

208 There was no effect of treatment, day and treatment x day relationship for milk
209 production and lactose concentration in milk ($P > 0.05$) (Table 1). A treatment effect was
210 observed in the fat concentration ($p = 0.05$), significantly higher in the milk of cows that
211 consumed the homeopathic product. We also found a tendency for a higher percentage of
212 total solids in the treated cows ($p = 0.08$) (Table 1). Effect of the day was observed for
213 protein, fat, total solids, and urea in the milk of cows in both groups (Table 1).

214

215 3.2. Milk quality

216 There was a tendency effect in the treatment x day ratio for the variable somatic cell
217 count in milk ($p = 0.09$), with a lower SCC in the milk of cows that consumed the
218 homeopathic product on days 15 and 30 of the experiment (Table 2). For this variable, there
219 was no effect of treatment or day ($P > 0.05$).

220 A treatment effect was observed for variable TBC in milk ($p = 0.05$), lower in cows in
221 the treated group than in the control group (Table 2). We also found an effect of the day for
222 TBC in milk in both groups of cows ($p = 0.01$).

223

224 3.3. Serum biochemistry

225 There was a trend of treatment effect x day for serum albumin levels ($p = 0.09$),
226 higher in the serum of cows in the treatment group on day 30 of the experiment (Table 3).
227 We also found a tendency toward a treatment effect for total protein levels ($P = 0.10$), higher
228 in the serum of cows that consumed the homeopathic product (Table 3). There were effects
229 of the day for both groups with respect to total protein and globulin (Table 3). However, the
230 effects of treatment, day and the treatment x day relationship were not observed for urea,
231 cholesterol, triglycerides, or glucose ($p > 0.05$) (Table 3).

232

233 3.4. Hematological analysis

234 A treatment effect was observed for total leukocytes ($p = 0.05$) and lymphocytes ($p =$
235 0.02) during the experimental period, with both variables showing lower counts in the blood
236 of cows that consumed homeopathic product (Table 4). We found a trend of the treatment x
237 day effect for the number of neutrophils ($p = 0.07$), that is, neutrophil counts were lower in
238 the blood of cows in the treated group than in the control group on day 90 of the experiment
239 (Table 4). An effect of the day was observed for both groups ($p < 0.05$) for hemoglobin
240 concentration, number of erythrocytes, number of total leukocytes, neutrophils, and
241 eosinophils (Table 4).

242

243 3.5 Pearson correlation

244 The results of Pearson's correlation by treatment are shown in Table 5. In both
245 groups, there was a negative correlation between milk production and milk composition (fat,
246 protein, total solids); there was a positive correlation trend between milk production and urea
247 in milk only in the treated group. Only in the milk of cows in the treated group did we see a
248 negative correlation between milk production and milk quality (SCC and TBC), that is, the
249 higher the milk production, the lower the levels of SCC and TBC in that group. In both
250 groups, we found a positive correlation between SCC and TBC (Table 5).

251 The results of Pearson's correlation considering cows from the two treatments are
252 presented in Supplementary Table 2. There was a negative correlation between milk
253 production and milk quality (fat, protein, total solids, TBC, and SCC) and white blood cells
254 (leukocytes and lymphocytes); as well as positive correlation between milk production and
255 urea levels in milk. There was a positive correlation between TBC and SCC, different from
256 the correlation between TBC versus blood count (erythrocytes, leukocytes and eosinophils),
257 which was negative.

258

259 3.6 Microbiological isolation in milk

260 In both groups, the most isolated bacteria were *Staphylococcus* and *Corynebacterium*,
261 followed by *Streptococcus*, with *Staphylococcus hyicus* being the most prevalent in both
262 groups. *Corynebacterium* spp. were isolated from more animals on days 30, 60, and 90 in
263 both groups; however, these were not isolated from any animals on day 1.

264

265 4. Discussion

266 The effect of the homeopathic product was not significant in all the variables
267 analyzed. However, higher fat content related to lower TBC and SCC in milk are desirable
268 results for the industry and for the regulatory structures in force in Brazil [18]. The fat
269 content in both groups was within the minimum limits recommended by IN 76 [18];
270 therefore, the increase in the fat content in cows that consumed homeopathic product is
271 important for higher yield of dairy production. Furthermore, farmers receive bonuses from
272 milk-collecting industries that provide milk-quality payment programs. The trend towards
273 higher percentages of total solids is probably related to the higher fat content in milk. We
274 believe that the desirable effects on milk quality are indirect effects of homeopathy; that is,
275 daily consumption improved the health of the cows, and this was reflected in the composition
276 and quality of their milk. Differently from our study, researchers found that there was a
277 tendency to increase SCC in milk when a homeopathic combination was provided to cows
278 with good mammary gland health [19]. Like the authors, we have not been able to increase
279 the SCC for this reason; as well as explaining the discrepancy between the results; although
280 we have worked with different homeopathic products.

281 Recently, we found that a homeopathic product indicated for the control of bacterial
282 infections stimulated immune responses and controlled experimental infections by *E. coli* in
283 an experimental model [20]. This can be explained by the reduction in levels of
284 environmental agents and the increase in levels of contagious agents during the experiment.
285 However, in the context of contagious mastitis, there is usually an increase in CSS, and this
286 was not seen in our experiment. This information is important for bovine mastitis, an
287 inflammatory pathology in the mammary gland caused mainly by bacteria, especially
288 *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *E. coli*, and *S. aureus*, among other
289 staphylococci, in addition to non-bacterial agents fungi and even microalgae, with *S. aureus*
290 being the pathogenic microorganism most frequently isolated in raw milk [21,22]. In our
291 study, *Corynebacterium* and *Staphylococcus* were the primary isolates. These bacteria
292 generate contagious mastitis but it is also an opportunistic agent and are transmitted between
293 animals via handling during milking [23]. *Corynebacterium* colonizes the teat channel of
294 dairy cows. It has been used as a hygiene indicator at the time of milking, as its prevalence
295 has been documented on farms where control of contagious mastitis is not correctly applied

296 [24]. In the present study, we did not verify the visual effect of homeopathic treatment; that
297 is, in both groups, the behavior of cows contaminated by microorganisms was similar.

298 The use of homeopathic agents has been increasing in recent years. These agents
299 function as immunological stimulants [25], and they have direct effects on the control of
300 diarrhea, decreasing the count of pathogenic bacteria in the feces of calves and lambs
301 [26,27]. Phytotherapeutics and minerals are used in mixtures of homeopathic compounds
302 because of their immunological properties [28]. Homeopathic drugs differ from allopathic
303 medicines in that they have extremely low concentrations, in order to be safer and present
304 lower risks of toxicity [29].

305 As already mentioned, the formulation of homeopathic products uses ingredients of
306 specific interest, following the guidelines of the Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia. For
307 example, *Colibacillinum* was used to produce the homeopathic used in this study; it has
308 antimicrobial effects that have been described in the literature, in particular, control of
309 infections by *E. coli* [30]. *Silicea terra* helps treat infectious and inflammatory diseases [31].
310 *Phytolacca* is a plant that has biological properties capable of controlling diseases of the
311 mammary glands, including clinical and subclinical mastitis [32, 33]. Our findings suggest
312 that, directly or indirectly, the homeopathic product reduced bacterial counts in milk,
313 fulfilling its antimicrobial purpose when added to the formulation of the commercial product.

314 [32] carried out a study with three groups of animals experimentally inoculated with
315 *S. aureus* and treated with a homeopathic and sodium cefoperazone, maintaining a group as a
316 control. The homeopathic used by the researchers included some ingredients also present in
317 the commercial product tested in the current study [32]; the authors found that cows with
318 clinical mastitis and subjected to homeopathic treatment were those with the highest
319 percentage of cured mastitis (negative CMT test) when compared to other treatments. In our
320 study, we did not have any cows with clinical mastitis during the experimental period; and
321 subclinical mastitis evaluated by analyzing individual CCS per animal at each collection;
322 nevertheless, the negative correlation between milk production and SCC and TBC suggests
323 that the intake of homeopathic had positive effects on the health of the mammary gland,
324 reducing the number of cows with subclinical mastitis. We cannot explain why the SCC
325 decreased in cows that consumed the homeopathic agent in the first 30 days of the

326 experiment; nevertheless, SCC increased again in subsequent analyzes, perhaps due to the
327 increase in levels of contagious agents.

328 Homeopathic agents are also important for reducing bacterial resistance to antibiotics,
329 and for increasing their curative and/or preventive effects [34]. The mechanisms by which a
330 homeopathic product controls mastitis may involve technical explanations described above;
331 nevertheless, we cannot discard the principles of homeopathy. According to the literature,
332 homeopathy encourages healing mechanisms through immune stimulation to fight viruses,
333 bacteria, fungi, tumors, and other diseases, allowing the restoration of balance in the animal's
334 system and encouraging organic responses that can lead to a reduction of stress [35], as well
335 as stimulating the proliferation of leukocytes in healthy dogs that consumed a homeopathic
336 product daily [36]. Homeopathic medicines can decrease microbial infection by
337 strengthening immunity [5]. We believe that the lower contamination by microorganisms of
338 the mammary gland (lower TBC) reduced the inflammatory response, explaining the lower
339 counts of total leukocytes, lymphocytes, and neutrophils in the blood of cows that consumed
340 the homeopathic. The leukogram results suggest that the homeopathic product indirectly
341 reduced the systemic inflammatory response, which is positive in farm animals, because
342 animals spend less energy (ATP) to activate defense cells, and so this energy can be used for
343 milk production. In the present study, we did not identify an effect of the treatment on the
344 volume of milk produced by the cows; however, when we correlated milk production with
345 SCC and TBC, we found that there was an effect of the homeopathic treatment on milk
346 production, because the cows that had better milk quality (lower SCC and TBC) were the
347 ones that produced more milk.

348 Despite there being lower lymphocyte counts in cows that consumed the homeopathic
349 product, this did not negatively affect levels of total protein and globulins in the serum; by
350 contrast, we found numerically higher levels of total protein in these animals. Importantly,
351 the low white blood cell counts in healthy animals is expected, because there is no need to
352 destroy pathogens [37,38]; similarly, this is important for maintaining high levels of
353 globulins, the animal's humoral defense system. Other studies reported an increase in the
354 number of lymphocytes when the animals received homeopathic medicines [39,40,41,42],
355 unlike what we reported here. We believe that the lower degree of bacterial contamination in
356 the mammary gland was responsible for the reduction of lymphocytes and neutrophils,

357 because these are the first lines of immune defense against pathogens [43]. In particular,
358 neutrophils destroy pathogens by phagocytosis, production of reactive oxygen species, as
359 well as secretion of antimicrobial peptides [44].

360 We did not observe any effects of the homeopathic agent on red blood cell counts, or
361 on systemic carbohydrate, lipid, and protein metabolism. Nevertheless, in milk, we observed
362 a positive correlation between milk production and urea levels; this can be interpreted as a
363 positive effect that may be related to better metabolic health of these animals.

364

365 **5. Conclusion**

366 The consumption of the homeopathic product by the cows had positive effects on the
367 quality of the milk, particularly the reduction of TBC and higher fat content in the milk. We
368 conclude that there is an effect of homeopathic treatment on productive efficiency and milk
369 quality, demonstrated by the finding that the cows that consumed the homeopathic agent had
370 higher milk production and lower SCC and TBC. Cows that consumed homeopathic agent
371 had lower total leukocyte, lymphocyte, and neutrophil counts, and this is likely related to
372 lower degrees of bacterial contamination in the mammary gland.

373

374 **Ethics committee**

375 This project was approved by the Committee for the Use of Animals in Research
376 (CEUA) of the University of the State of Santa Catarina (UDESC) under protocol number
377 2000060919.

378

379 **References**

380 [1] Simões, T. V. M. D., Oliveira, A. A. Mastite Bovina, Considerações e impactos
381 econômicos. p. 27, 2012

382 [2] Vragović, N. et al. Risk assessment of streptomycin and tetracycline residues in meat and
383 milk on Croatian market. Food and Chemical Toxicology, 49 (2011) 352-355

384 [3] FAO/WHO. **Codex Alimentarius** Commission. Maximum residue limits (MRLs) and
385 risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods.
386 Switzerland: CAC/MRL 2- (2015) 41p.

- 387 [4] Busanello M. et al. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a
388 large population of Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 8 (2017) 6545–
389 6553.
- 390 [5] Bonamin, L. V. Homeopathy and experimental infections: In vivo and in vitro
391 experiments with bacteria, fungi and protozoan. *La Revue d'Homéopathie*.
392 doi:10.1016/j.revhom.2019.10.023. 2019.
- 393 [6] Doehring C., Sundrum A. Efficacy of homeopathy in livestock according to peer-
394 reviewed publications from 1981 to 2014. *Vet Rec*.179 (2016) 1–13.
- 395 [7] Mathie R.T., Clausen J. Veterinary homeopathy: meta-analysis of randomised placebo-
396 controlled trials. *Homeopathy*. 104 (2015) 3–8.
- 397 [8] Werner, C., Sundrum, A. Comparison of homeopathic and chemotherapeutic treatment
398 strategies in the case of bovine clinical mastitis. In: *Joint Organic Congress*, 8 (2006),
399 Odense, Denmark.
- 400 [9] Santos, M. V., Fonseca, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da
401 qualidade do leite. Pirassununga, SP: 2007.
- 402 [10] Dahl, E. G., Tao, S., Laporta, J. Heat Stress Impacts Immune Status in Cows Across the
403 Life Cycle. *Front. Vet. Sci.*, 7:116 (2020) 1-15.
- 404 [11] NETO, F. P., Zappa, V. Mastite Em Vacas Leiteiras- Revisão De Literatura. *Revista*
405 *Científica Eletrônica De Medicina Veterinária*, 16 (2011) 1679–7353.
- 406 [12] NMC- National Mastitis Council. Microbiological procedures for the diagnosis of
407 bovine udder infection and determination of milk quality. 4th ed. NMC (2004) Verona.
- 408 [13] ISO 9622 / IDF 141: Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of
409 mid-infrared spectrometry. Brussels, Belgium, 2013. 14p.
- 410 [14] ISO 13366-2 / IDF 148-2: Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on
411 the operation of fluoro-optoelectronic counters. Brussels, Belgium, 2006. 15p
- 412 [15] ISO 16297 / IDF 161: Milk – Bacterial Count – Protocol for the evaluation of alternative
413 methods. Brussels, Belgium, 2013.
- 414 [16] ISO 21187 / IDF 196: Milk – Quantitative determination of bacteriological quality –
415 Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method
416 results and anchor method results. Brussels, Belgium, 01/12/2004. 13p.

- 417 [17] Markey, B. et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Mosby Elsevier, London.
418 2013.
- 419 [18] Brasil. Instrução Normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018. Estabelece o
420 Regulamento para fixar a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o
421 leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da
422 República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, 9 p., 30 nov. 2018.
- 423 [19] Silva, J. R. et al. Suplementação de vacas leiteiras com homeopatia: células somáticas
424 do leite, cortisol e imunidade. *Arq. bras. med. vet. zootec*, 63 (2011) 805-813.
- 425 [20] Jaguezski, A.M. et al. Daily consumption of a homeopathic product decreases
426 intestinal damage and stool bacterial counts in mice challenged with *Escherichia coli*.
427 *Microbial pathogenesis*: 147 (2020) 104269.
- 428 [21] Zecconi, A., Hahn, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk.
429 *Bulletin of IDF*, 345 (2000) 15-18.
- 430 [22] Langoni, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa*
431 *Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro. 31 (2011) 1059-1065.
- 432 [23] Tomazi T. et al. Identification of Coagulase-Negative Staphylococci from Bovine
433 Intramammary Infection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight
434 Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 52 (2014) 1658–1663.
- 435 [24] Gonçalves J. L. et al. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium*
436 spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters.
437 *Journal of Dairy Science* 99 (2016) 87-92.
- 438 [25] Mazón-Suástegui J. M. et al. Homeopathy outperforms antibiotics treatment in juvenile
439 scallop *Argopecten ventricosus*: effects on growth, survival, and immune response.
440 *Homeopathy*. 106 (2017) 18-26.
- 441 [26] Fortuoso, B. F.; Volpato, A.; Rampazzo, L.; Glombowsky, P.; Griss, L. G.; Galli, G. M.;
442 Stefani, L. M.; Baldissera, M. D.; Ferreira, E. B.; Machado, G.; Da Silva, A. S. Homeopathic
443 treatment as an alternative prophylactic to minimize bacterial infection and prevent neonatal
444 diarrhea in calves. *Microbial Pathogenesis*, 114 (2018) 95-98.
- 445 [27] Fortuoso, B. F.; Gebert, R. R.; Griss, L.G.; Glombowsky, P.; Cazarotto, C. J.;
446 Rampazzo, L.; Stefani, L. M.; Ferreira, E. B.; Da Silva, A. S. Reduction of stool bacterial

- 447 counts and prevention of diarrhea using an oral homeopathic product in newborn lambs.
448 *Microbial Pathogenesis*, 127 (2019) 347-351.
- 449 [28] Kayne, S. Homeopathic veterinary prescribing. *British homeopathic Journal*, 81(1),
450 (1992) 25-8.
- 451 [29] Halberstein, R. A Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals*
452 *of epidemiology*, 15(9) (2005) 686-699.
- 453 [30] Lopes, A.C. Diagnóstico e tratamento. In: Introdução as práticas médicas heterodoxas.
454 Flávio Dantas. Editora Manole Ltda. (2006) 411- 421.1051p.
- 455 [31] Ribeiro Filho A. Repertório De Sintomas Clínicos Em Homeopatia. 1ª ed. São Paulo:
456 Organon (2017); 286 p.
- 457 [32] Almeida, A. C. et al. Eficácia de tratamento homeopático no controle da mastite
458 subclínica em bovinos. *Veterinária Notícias*, Uberlândia, 11, n. 2 (2005) 53-59.
- 459 [33] Mangiéri J. R., Souto, L. I. M., Melville, P. A., Benites, N. R. Avaliação de tratamento
460 homeopático na mastite bovina subclínica. *Veterinária e Zootecnia*, 14 (2007) 91-99.
- 461 [34] Weiermayer, P. Wound Healing Disorder in a Horse, Associated With Antimicrobial-
462 Resistant Bacteria, Resolved With a Homeopathic Medicine-A Case Report. *Journal of*
463 *equine veterinary science*, 67 (2018) 37-43.
- 464 [35] Da Costa Filho, L. C. C. et al. Homeopatia aplicada à reprodução animal. *Arq. Ciênc.*
465 *Vet. Zool. UNIPAR* 17 (2014) 63- 68.
- 466 [36] Marchiori, M. S., Da Silva, A. S., Glombowsky, P., Campigotto, G., Favaretto, J. A.,
467 Jaguezeski, A. M. homeopathic product in dog diets modulate blood cell responses. *Archives*
468 *of veterinary science*, 24 (2019) 92-101.
- 469 [37] Salami F., Tavassoli A., Mehrzad J., Parham A. Immunomodulatory effects of
470 mesenchymal stem cells on leukocytes with emphasis on neutrophils. *Immunobiology* 223
471 (2018) 786-791.
- 472 [38] Duan Y. et al. Leukocyte classification based on spatial and spectral features of
473 microscopic hyperspectral images. *Optics & Laser Technology* 112 (2019) 530-538.
- 474 [39] Leal MF et al. The protective effect of Canova Homeopathic medicine in
475 cyclophosphamide-treated non-human primates. *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012)
476 4412-4420.

- 477 [40] Abud A. P. R. et al. Activation of bone marrow cells treated with Canova in vitro. Cell
478 Biology Internaational. 30 (2006) 808-816.
- 479 [41] Burbano R. R. et al. Lymphocyte proliferation stimulated by activated human
480 macrophages treated with Canova. Homeopathy 98 (2009) 45-48.
- 481 [42] Cesar B. et al. Activation of mononuclear bone marrow cells treated in vitro with a
482 complex homeopathic medication. Micron 39 (2008) 461-470.
- 483 [43] Cohn, Z. A., Hirsch, J.G. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution
484 of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. J. Exp. Med. 112 (1960)
485 1015- 1022.
- 486 [44] Dale D. C., Boxer L. W. C. L. The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood.
487 112(4) (2008) 935-45.

488 **Table 1.** Milk production and quality of dairy cows that received homeopathic product via
 489 diet (treated group) compared to cows in the control group.

Variables ¹	Treatments ²		SEM	P – values ³		
	Control	Treated		Treat	Day	Treat × Day
Milk Production (L/day)				0.86	0.20	0.59
d 1	17.58	17.83	0.52			
d 15	18.74	17.68	0.52			
d 30	17.39	17.49	0.52			
d 45	17.49	17.64	0.52			
d 60	17.82	17.58	0.52			
d 75	17.29	17.00	0.52			
d 90	17.00	17.37	0.52			
Average	17.55	17.47	0.42			
Protein (%)				0.41	0.01	0.58
d 1	3.22 ^{BC}	3.19 ^B	0.07			
d 15	3.18 ^C	3.19 ^B	0.06			
d 30	3.15 ^C	3.07 ^C	0.06			
d 45	3.21 ^{BC}	3.27 ^A	0.06			
d 60	3.27 ^{BC}	3.28 ^A	0.07			
d 75	3.40 ^A	3.31 ^A	0.07			
d 90	3.31 ^{AB}	3.25 ^A	0.06			
Average	3.25	3.20	0.05			
Fat (%)				0.05	0.05	0.55
d 1	4.26 ^A	4.11 ^{AB}	0.44			
d 15	3.34 ^B	3.92 ^{AB}	0.44			
d 30	3.78 ^{AB}	4.21 ^{AB}	0.44			
d 45	3.76 ^{AB}	3.72 ^B	0.44			
d 60	3.69 ^B	4.00 ^{AB}	0.44			
d 75	3.76 ^{AB}	4.07 ^{AB}	0.44			
d 90	3.99 ^{AB}	4.33 ^A	0.44			
Average	3.80 ^x	4.05 ^y	0.40			
Lactose (%)				0.26	0.25	0.63
d 1	4.46	4.44	0.03			
d 15	4.43	4.51	0.03			
d 30	4.42	4.51	0.03			
d 45	4.49	4.55	0.03			
d 60	4.45	4.45	0.03			
d 75	4.45	4.49	0.03			
d 90	4.44	4.43	0.03			
Average	4.45	4.48	0.02			
Total solids (%)				0.08	0.01	0.48
d 1	12.89 ^{AB}	12.67 ^{AB}	0.52			
d 15	11.84 ^{AB}	12.44 ^B	0.52			
d 30	12.25 ^{BC}	12.72 ^{AB}	0.52			

d 45	12.42 ^{AB}	12.54 ^B	0.52			
d 60	12.34 ^{BC}	12.59 ^{AB}	0.52			
d 75	12.51 ^C	12.70 ^{AB}	0.52			
d 90	12.65 ^A	13.08 ^A	0.52			
Average	12.41 ^x	12.68 ^y	0.48			
Urea				0.13	0.01	0.37
d 1	16.28 ^{BC}	16.52 ^B	0.81			
d 15	21.33 ^A	21.90 ^A	0.81			
d 30	15.64 ^{BC}	16.32 ^B	0.81			
d 45	15.36 ^{BC}	15.97 ^B	0.81			
d 60	13.45 ^{CD}	14.79 ^B	1.41			
d 75	12.50 ^D	15.40 ^B	0.81			
d 90	10.36 ^E	9.51 ^C	0.81			
Average	14.98	15.77	0.37			

490 ¹Control and Treated represents control cows and those that received homeopathic product
 491 via diet daily, respectively.

492 ^{x-y}Within a row, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

493 ^{A-E}Within treatment, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq$
 494 0.10).

495

496 **Table 2.** Somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC) values in the milk of dairy
 497 cows that received homeopathic product via diet (treated group) compared to cows in the
 498 control group.

Items ¹	Treatments ²		SEM	P – values ³		
	Control	Treated		Treat	Day	Treat × Day
SCC (CS/mL)				0.30	0.57	0.09
d 1	424.62	372.33	109.81			
d 15	688.62 ^x	293.55 ^y	109.81			
d 30	650.71 ^x	352.51 ^y	109.81			
d 45	325.57	363.59	109.81			
d 60	397.71	442.64	109.81			
d 75	307.05	384.72	109.81			
d 90	315.40	404.59	109.81			
Average	450.37	375.28	59.90			
TBC (UFC/mL)				0.05	0.01	0.56
d 1	118.32 ^A	78.02 ^{AB}	28.77			
d 15	35.43 ^B	32.27 ^B	28.77			
d 30	76.40 ^{AB}	42.07 ^B	28.77			
d 45	49.21 ^B	42.40 ^B	28.77			
d 60	60.09 ^B	77.65 ^{AB}	28.77			
d 75	72.67 ^{AB}	33.13 ^B	29.11			
d 90	112.21 ^A	95.36 ^A	28.77			
Average	74.90 ^x	57.27 ^y	21.20			
Subclinical mastitis incidence (%)				0.07	0.18	0.15
d 1	51.58	57.12	0.06			
d 15	51.58	44.08	0.06			
d 30	68.97	52.77	0.06			
d 45	68.97	52.77	0.06			
d 60	68.97	44.08	0.06			
d 75	64.62	65.82	0.06			
d 90	73.31	57.12	0.06			
Average	64.00 ^x	53.39 ^y	0.05			

499 ¹Somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC).

500 ²Control and Treated represents control cows and cows that received homeopathic product
 501 via diet daily, respectively.

502 ^{x-y}Within a row, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

503 ^{A-E}Within treatment, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq$
 504 0.10).

505

506 **Table 3.** Biochemistry serum of dairy cows that received homeopathic product via diet
 507 (treated group) compared to cows in the control group.

Items	Treatments ¹		SEM	P – values ²		
	Control	Treated		Treat	Day	Treat × Day
Albumin (g/dL)				0.25	0.45	0.09
d 1	3.48	3.10	0.35			
d 30	2.65 ^x	3.58 ^y	0.32			
d 60	2.48	2.74	0.34			
d 90	2.42	3.22	0.40			
Average	2.75	3.16	0.30			
Total protein (g/dL)				0.10	0.01	0.86
d 1	8.81 ^A	9.14 ^{AB}	1.12			
d 30	8.09 ^{AB}	9.26 ^A	1.11			
d 60	9.32 ^A	9.75 ^A	1.11			
d 90	7.41 ^B	8.11 ^B	1.11			
Average	8.40 ^x	9.07 ^y	1.00			
Globulin (g/dL)				0.14	0.01	0.38
d 1	5.33 ^B	6.04 ^{AB}	0.78			
d 30	5.44 ^B	5.68 ^B	0.77			
d 60	6.84 ^A	7.01 ^a	0.77			
d 90	4.99 ^B	4.89 ^B	0.76			
Average	5.65	5.91	0.71			
Urea (mg/dL)				0.55	0.20	0.42
d 1	31.08	26.36	3.84			
d 30	32.39	35.20	3.51			
d 60	35.88	36.19	3.77			
d 90	29.86	22.86	4.21			
Average	32.30	30.15	2.51			
Cholesterol (mg/dL)				0.77	0.35	0.93
d 1	127.99	133.94	18.59			
d 30	124.95	136.40	16.71			
d 60	155.83	151.41	17.61			
d 90	105.45	114.11	20.68			
Average	128.55	133.96	13.47			
Triglycerides (mg/dL)				0.14	0.59	0.70
d 1	33.44	33.16	6.60			
d 30	38.76	31.23	5.92			
d 60	37.63	29.96	6.50			
d 90	49.60	36.71	7.34			
Average	39.86	32.77	4.36			
Glucose (mg/dL)				0.97	0.18	0.30
d 1	60.08	62.44	6.83			
d 30	53.51	43.15	6.20			
d 60	60.74	61.76	6.50			
d 90	47.15	55.10	7.33			

Average	59.40	56.95	3.63
508 ¹ Control and Treated represents control cows and cows that received homeopathic product 509 via diet daily, respectively.			
510 ^{x-y} Within a row, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).			
511 ^{A-B} Within treatment, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq$ 512 0.10).			
513			

514 **Table 4.** Values of hematological analysis of dairy cows that received homeopathic product
 515 via diet (treated group) compared to cows in the control group.

Items	Treatments ¹		SEM	P – values ²		
	Control	Treated		Treat	Day	Treat × Day
Hematocrit (%)				0.37	0.13	0.90
d 1	26.23	28.30	1.92			
d 30	24.83	24.37	1.81			
d 60	23.31	25.54	1.96			
d 90	27.89	28.77	2.12			
Average	25.56	26.75	1.04			
Hemoglobin (g/dL)				0.35	0.01	0.96
d 1	8.10 ^B	7.91 ^{BC}	0.25			
d 30	8.63 ^A	8.29 ^{AB}	0.23			
d 60	8.86 ^A	8.60 ^A	0.26			
d 90	8.03 ^B	7.72 ^C	0.29			
Average	8.40	8.13	0.18			
Erythrocytes (x10 ⁶ /μL)				0.37	0.01	0.45
d 1	5.03 ^{AB}	5.14 ^A	0.24			
d 30	5.33 ^B	5.22 ^A	0.24			
d 60	4.62 ^C	4.57 ^B	0.24			
d 90	4.88 ^{BC}	4.53 ^B	0.24			
Average	4.96	4.87	0.20			
Leukocytes (x10 ³ /μL)				0.05	0.01	0.12
d 1	5.71 ^B	3.11 ^B	1.84			
d 30	11.91 ^A	3.93 ^B	1.62			
d 60	12.70 ^A	8.91 ^A	1.63			
d 90	13.32 ^A	10.46 ^A	1.86			
Average	10.91 ^x	6.60 ^y	1.43			
Neutrophils (x10 ³ /μL)				0.44	0.09	0.07
d 1	1.50 ^B	2.26 ^A	0.90			
d 30	4.24 ^A	3.23 ^A	0.77			
d 60	3.36 ^{AB}	3.24 ^A	0.83			
d 90	5.40 ^{Ax}	3.09 ^{Ay}	1.02			
Average	3.62	2.95	0.60			
Lymphocytes (x10 ³ /μL)				0.02	0.12	0.35
d 1	7.40	4.53	0.94			
d 30	7.65	4.14	0.94			
d 60	7.82	5.25	0.94			
d 90	6.79	4.59	0.94			
Average	7.42 ^x	4.63 ^y	0.86			
Monocytes (x10 ³ /μL)				0.66	0.11	0.77
d 1	0.54	0.51	0.12			
d 30	0.43	0.42	0.12			
d 60	0.35	0.37	0.12			
d 90	0.36	0.23	0.12			

Average	0.42	0.39	0.10			
Eosinophils ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				0.82	0.01	0.87
d 1	0.13 ^{AB}	0.09 ^B	0.03			
d 30	0.19 ^A	0.19 ^A	0.03			
d 60	0.15 ^A	0.14 ^{AB}	0.03			
d 90	0.08 ^B	0.09 ^B	0.03			
Average	0.14	0.13	0.02			

516 ¹Control and Treated represents control cows and cows that received homeopathic product
517 via diet daily, respectively.

518 ^{x-y}Within a row, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

519 ^{A-C}Within treatment, without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq$
520 0.10).

521

522

523 **Table 5.** Pearson correlation coefficients among milk production versus milk quality (fat,
524 protein, total solids, urea, TBC and SCC) and TBC versus SCC to control group and treated
525 group, evaluated separate by group.

Variables ¹	Treatments			
	Control		Treated	
	Correlation coefficients	<i>P</i> - values	Correlation coefficients	<i>P</i> - values
Milk Production (L/day)				
× Milk fat (%)	-0.42	0.01	-0.21	0.01
× Milk protein (%)	-0.39	0.01	-0.27	0.01
× Milk total solids (%)	-0.50	0.01	-0.22	0.01
× Urea (%)	0.14	0.09	0.18	0.05
× TBC (UFC/mL)	-0.07	0.37	-0.19	0.01
× SCC (CS/mL)	-0.08	0.32	-0.21	0.01
TBC (UFC/mL)				
× SCC (CS/mL)	0.47	0.01	0.36	0.01

526 ¹Somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC). Only show the variables that
527 differ ($P \leq 0.05$) or tended to differ ($0.05 > P \leq 0.10$).

528

529 **Table 6.** Bacteria isolated from the milk of cows in the control and treated groups
 530 (homeopathic product) in four moments of collection (day 1, 30, 60 and 90).

Results/bacteria	Day 1 (n/group)		Day 30 (n/group)		Day 60 (n/group)		Day 90 (n/group)	
	CON	TREAT	CON	TREAT	CON	TREAT	CON	TREAT
No bacterial growth	3	5	1	4	3	2	3	3
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	4	2	2	1	-	2	-	1
<i>Chromobacterium</i>	2	3	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i>	-	-	5	5	2	2	7	8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	2	-	-	1	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Staphylococcus acidominimus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4	3	3	2	3	2	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	3	2	2	7	6	3	1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	8	6	6	4	7	9	5	4
<i>Staphylococcus intermedius</i>	2	1	2	1	-	1	4	2
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Streptococcus acidominimus</i>	1	-	1	3	-	-	1	2
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	2	-	-	-	1	-	-	-
<i>Streptococcus equinus</i>	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	-	-	1	4	1	3	5	4
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	1	1	1

<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	2	-	-	1	1	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	2	1	-	-	1	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	-	-	1	-	-	2	-	-
<i>Citrobacter diversus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Trueperella</i> spp.	-	-	-	-	2	1	-	-

532 **Supplementary Table 1:** Feed used in cow feeding and chemical composition of feed.

	Property A		Property B	
Feed				
Concentrate (kg MS/animal) ¹	7		5	
Forage ²	ad libitum		ad libitum	
Chemical composition³				
	Fodder	Concentrate	Fodder	concentrate
Dry matter	37.3 (6.7)	88.6 (0.96)	26.3 (0.67)	88.7 (0.67)
Crude protein	11.1 (3.5)	19.1 (5.2)	7.78 (1.05)	17.7 (0.47)
Ethereal extract	2.34 (0.46)	4.73 (0.83)	3.35 (0.22)	4.72 (0.33)
Ash	6.76 (2.2)	6.85 (0.25)	5.69 (0.24)	7.34 (0.64)
Crude fiber	-	5.64 (0.90)	-	5.42 (0.42)
NDF	44.2 (2.15)	-	46.7 (4.17)	-
ADF	26.8 (1.28)	-	30.1 (2.52)	-

533 ¹ The concentrate was formulated based on corn, soy bean, wheat bran and mineral, acquired
534 commercially by producers

535 ² The experiment lasted 90 days, so the forage available to cows differed during the
536 experimental period, with emphasis on silage and hay.

537 ³ For analysis of the chemical composition, samples were collected at three times (beginning,
538 middle and end); samples analyzed separately and results presented as means and standard
539 deviations.

540

541 **Supplementary Table 2.** Pearson correlation coefficients among milk production versus
 542 milk quality (fat, protein, total solids, urea, TBC and SCC) and white blood cells (Leukocytes
 543 and lymphocytes); TBC versus SCC; TBC versus hemogram (erythrocytes, leukocytes and
 544 eosinophils) considering data from cows from both groups.

Variables ¹	Pearson correlation coefficients	P - values
Milk Production (L/day)		
× Milk fat (%)	-0.31	0.01
× Milk prot (%)	-0.34	0.01
× Milk total solids (%)	-0.36	0.01
× Urea (%)	0.15	0.01
× TBC (UFC/mL)	-0.14	0.01
× SCC (CS/mL)	-0.17	0.01
× Leukocytes (x10 ³ μL)	-0.20	0.01
× Lymphocytes (x10 ³ /μL)	-0.21	0.01
TBC (UFC/mL)		
× SCC (CS/mL)	0.39	0.01
× Erythrocytes (x10 ⁶ μL)	-0.19	0.03
× Leukocytes (x10 ³ μL)	-0.18	0.05
× Eosinophils (x10 ³ /μL)	-0.17	0.05

545 ¹Somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC). Only show the variables that
 546 differ ($P \leq 0.05$) or tended to differ (0.0
 547
 548
 549
 550
 551
 552
 553
 554
 555
 556
 557
 558
 559
 560
 561
 562
 563
 564
 565
 566
 567

REFERÊNCIAS

- 568
569
570 ASSIS, A. G de. Sistemas de produção de leite no Brasil. Circular técnica, n.85, p.6, ISSN
571 1517-4816, 1ª ed, **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, MG, 2005.
- 572 AUBRY, E. et al. Early udder inflammation in dairy cows treated by a homeopathic
573 medicine (Dolisovet Ô): a prospective observational pilot study. **Homeopathy**. p. 139–144,
574 2013.
- 575 BATELLO, Celso Fernandes. **Homeopatia x Alopátia: uma abordagem sobre o assunto**.
576 2ª ed. Ground; 1994.
- 577 BELOTI, Vanerli. Fatores que interferem na qualidade e composição do leite produzido. In:
578 BELOTI, Vanerli (Org.). **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Planta, 2015. p.
579 35-50.
- 580 BERGQUIST, P. E. Therapeutic Homeopathy. **Integrative Medicine**. Chapter 115. 1064-
581 1072. 2018.
- 582 BITTANTE, G. et al. Comparison between genetic parameters of cheese yield and nutrient
583 recovery or whey loss traits measured from individual model cheese-making methods or
584 predicted from unprocessed bovine milk samples using Fourier-transform infrared
585 spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.6560-6572, 2014.
- 586 BITTANTE, G.; CIPOLAT-GOTET, C.; CECCHINATO, A. Genetic parameters of different
587 measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model
588 cheesemanufacturing process. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.7966-7979, 2013.
- 589 BRASIL. Instrução Normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018. Estabelece o Regulamento
590 para fixar a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru
591 refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da República**
592 **Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, 9 p., 30 nov. 2018.
- 593 BUITENHUIS, B. et al. Estimation of genetic parameters and detection of chromosomal
594 regions affecting the major milk proteins and their post translational modification in Danish
595 Holstein and Danish Jersey cattle. **BMC Genetics**, v.17, p.114, 2016.
- 596 CARNEIRO, Solange Monteiro de Toledo Piza Gomes. **Homeopatia/ princípios e**
597 **aplicações na agroecologia**. Londrina: IAPAR, 2011. 234 p.
- 598 CEC, COUNCIL REGULATION. **No 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of**
599 **agricultural products and indications referring there to on agricultural products and**
600 **foodstuffs**. n. 2092, p. 1–95, 1991.
- 601 CECCHINATO, A. et al. Genetic parameters of cheese yield and curd nutrient recovery or
602 whey loss traits predicted using Fourier-transform infrared spectroscopy of samples collected
603 during milk recording on Holstein, Brown Swiss, and Simmental dairy cows. **Journal of**
604 **Dairy Science**, 98, 4914-4927, 2015.

- 605 CHANDEL, B. S. et al. Efficacy of a Homeopathic complex and antibiotics in treatment of
606 clinical mastitic cattle in North Gujarat. **Veterinary World**, v. 2, n. 1, p. 383–384, 2009.
- 607 DE VliegHER, S., et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease,
608 potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science** v. 95, p. 1025–1040,
609 2012.
- 610 DOEHRING, C. & SUNDRUM, A. The informative value of an overview on antibiotic
611 consumption, treatment efficacy and cost of clinical mastitis at farm level. **Preventive**
612 **Veterinary Medicine**, 2019.
- 613 DUDGEON, Robert Ellis. **O princípio homeopático antes de Hahnemann**. Revista de
614 Homeopatia – APH. 59: 2. 1994.
- 615 EISENBERG, D. M. et al. Trends in Alternative Medicine Use in the United States , 1990-
616 1997 Results of a Follow-up National Survey. **Americal Medical Association**, v. 280, n. 18,
617 1998.
- 618 EMBRAPA. Indicadores: Leite e derivados. **Embrapa Gado de Leite**, ano 11, n.100, Juiz de
619 Fora, MG, 2020.
- 620 FISHER, P. & WARD, A. Medicine in Europe: Complementary medicine in Europe. **British**
621 **Medical Journal**, v. 309, n. July, p. 7–11, 1994.
- 622 FOURICHON, C. et al. Estimation des p _ertes et de l ’ impact économiques consécutifs
623 aux principaux troubles de santé en élevage bovin tâtier Assessment of economic losses and
624 total costs consecutive to production diseases in dairy herds. **Rencontres Recherches**
625 **Ruminants**, n. 8, p. 137-143, 2001.
- 626 HAHNEMANN, S. **Organon da arte de curar**. 6. Ed. São Paulo: Robe Editorial, 1996.
- 627 HEKTOEN, L. et al. Comparison of Homeopathy , Placebo and Antibiotic Treatment of
628 Clinical Mastitis in Dairy Cows – Methodological Issues and Results from a Randomized-
629 clinical Trial. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 446, p. 439–446, 2004.
- 630 HENRIKSEN, B. I. F., Stor interesse for homeopati og urtemedisin hos norske økobønder
631 (Huge interest in homeopathy and herbal medicine among Norwegian organic farmers).
632 **Praksisnytt**, v. 7, p. 55–58, 2002.
- 633 HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GÓMEZ-RUIZ, J. Bioactive components of
634 ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**, v.101, p.196-204, 2011.
- 635 HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow - A tradition or an archaism.
636 **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1250–1255, 2005.
- 637 HOVI, M., and RODERICK, R; Mastitis and mastitis control strategies in organic milking.
638 **Cattle Pract**. V. 8, p. 259–264, 2000.
- 639 IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Pecuária Municipal, Rio
640 de Janeiro, v. 44, p.1-51, 2018.

- 641 IFOAM, International Federation of Organic Agriculture Movements. **The IFOAM**
642 **NORMS for organic production and processing**. 2014. Disponível em:
643 http://www.bioagricert.org/images/doc-it/IFOAM/ifoam_norms_2014.pdf Acesso em 09
644 maio 2020.
- 645 JENKINS, T. C.; MCGUIRET, M. A. Major advances in nutrition: Impact on milk
646 composition. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1302-1310, 2006.
- 647 KANWAR, J. R. et al. Molecular and biotechnological advances in milk proteins in relation
648 to human health. **Current Protein and Peptide Science**, v.10, p.308-338, 2009.
- 649 KESSLER, R. C. et al. Academia and Clinic Long-Term Trends in the Use of
650 Complementary and Alternative Medical Therapies in the United States. **Complementary**
651 **and alternative medicine series**, n. February 1998, 2001.
- 652 KIRSANOVA E. et al. Alternative subclinical mastitis traits for genetic evaluation in dairy
653 cattle. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.1-7, 2019.
- 654 KRUTZINNA C., BOEHNCKE E. & HERRMANN, H. J. Organic Milk Production in
655 Germany. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 13, p. 351-358. 1996.
- 656 LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do
657 leite pela contagem de células somáticas. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v.
658 3, f. 3, São Paulo, p. 57-64, 2000.]
- 659 LANGONI, Hélio. et al. **Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino**.
660 Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.31, n.12, p.1059-1065, 2011.
- 661 NMC- National Mastitis Council (US). Research Committee, Oliver, Stephen P and National
662 Mastitis Council (US). **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder**
663 **infection and determination of milk quality** (4th ed). NMC, Verona, Wis, 2004.
- 664 MARKUS, C. R. et al. Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma
665 tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive
666 performance in stress-vulnerable subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**,
667 v.75, p.1051-1056, 2002.
- 668 MERCK, C. C., SONNENWALD, B. and ROLLWAGE, H.; Untersuchungen u'ber den
669 Einsatz homo'opatischer Arzneimittel zur Behandlung akuter Mastitiden beim Rind. Berl.
670 Mu'rch Tiera'rztl. **Wschr**, v. 102, p. 266-272, 1989.
- 671 MICHAELSEN, K. F. et al. Cow's milk in treatment of moderate and severe undernutrition
672 in low-income countries. Nestlé Nutrition Institute Workshop series. **Pediatric Program**,
673 v.67, p.99-111, 2011.
- 674 MITIDIERO, Ana Maria de Andrade. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e**
675 **fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira : avaliação dos aspectos sanitários e de**
676 **produção**. Florianópolis, SC, 2002. xiii, 119 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade
677 Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
678 Agroecossistemas.

- 679 MONCAYO, F. **Efficacy of homeopathic preparations of autogenous mastitis causing**
680 **organisms in the prevention of mastitis in dairy cattle.** Part II: effect of an autogenous
681 nosode on the somatic cell count of lactating cows. *Org. Farming Res. Found. Proj. Rep.*,
682 v.99, p.4-7, 2000.
- 683 OLIVEIRA, A. S. de. et al. Identificação e quantificação de indicadores-referência de
684 sistemas de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.507-516, 2007.
- 685 PEREZ, M. D. et al. Effect of β -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible
686 role for this protein in ruminant milk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1123, p.151-155,
687 1992.
- 688 POITEVIN B. How can one evaluate the clinical effectiveness of homeopathic therapy?
689 Some thoughts about the report of the High Authority for Health. **La Revue d'Homéopathie**.
690 v. 10, p.59-67, 2019.
- 691 PORTES, Vagner Miranda; NETO, André Thaler; SOUZA, Guilherme Nunes de. Qualidade
692 do leite. In: CÓRDOVA, Ulisses de Arruda. **Produção de leite à base de pasto em Santa**
693 **Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2012. p. 517-551.
- 694 REIS, A. M. dos. et al. Efeito do grupo racial e do número de lactações sobre a produtividade
695 e a composição do leite bovino. **Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.3421-3436, 2012.
- 696 SANTOS, J. F. dos.; RODRIGUES, J. A. da S. Importância da caseína do leite, aspectos
697 econômicos e nutricionais. Levantamento do teor de caseína no leite das propriedades do
698 pool de leite ABC, APCBRH, PR. **Veterinária e Zootecnia**, v.20. n.1, p.151-152, 2013.
- 699 SCHALM, O. W., and NOORLANDER. D. O. Experiments and observations leading to
700 development of the California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical**
701 **Association**. V. 130, p.199–204, 1957.
- 702 SCHERPENZEEL, C. G. M., et al. Evaluation of the use of dry cow antibiotics in low
703 somatic count cows. **Journal of Dairy Science** v. 97, p.3606–3614, 2014.
- 704 SCHROEDER, J.W. Mastitis control programs: bovine mastitis and milking tmanagement.
705 Extension Bulletin AS 1129: North Dakota State University. 2012.
- 706 SEARCY, R.; REYES, O.; GUAJARDO, G. Control of subclinical bovine mastitis. **British**
707 **Homeopathic Journal**, v. 84 p. 67–70, 1995.
- 708 SEEGERS, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. Production effects related to mastitis and
709 mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Researchy**, 34, 475-491. 2003.
- 710 SILVA, L.A.F.; SILVA, E.B. da; ROMANI, A.F.; GARCIA, A.M. **Causas de descarte de**
711 **fêmeas bovinas leiteiras adultas**. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador,
712 v.5, p.9-17, 2004.
- 713 SILVA, H. A. da. et al. Análise da viabilidade econômica da produção de leite a pasto e com
714 suplementos na região dos Campos Gerais – Paraná. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.445-450,
715 2008.

- 716 SPRANGER, J., Richtlinienengema"sse, Pra"vention und Therapie in der Tierhaltung des
717 O"kolandbaus am Beispiel der Mastitis der Kuh. Dtsch. Tiera"rztl. **Wschr**, v. 105, p. 285–
718 332, 1998.
- 719 STEVENS, M., S. et al. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy
720 herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production
721 performance. **Journal of Dairy Science** v. 99, p. 2118–2130, 2016.
- 722 STOCCO, G. et al. Breed of cow and herd productivity affect milk nutrient recovery in curd,
723 and cheese yield, efficiency and daily production. **Animal**, v. 12, p.1-11, 2017.
- 724 SUTTON, L. F.JR.; ALSTON-MILLS, B. β -lactoglobulin as a potential modulator of
725 intestinal activity and morphology in neonatal piglets. **The Anatomical Record**. Part A,
726 v.288, p.601-608, 2006.
- 727 TEIXEIRA, Lúcia Martins et al. *Staphylococcus Aureus*. In: TRABULSI Luiz Rachid,
728 ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- 729 TEIXEIRA Marcus Zulian. **Semelhante cura semelhante: o princípio de cura**
730 **homeopático fundamentado pela racionalidade médica e científica**. 2ª ed. São Paulo:
731 Marcus Zulian Teixeira, 2015.
- 732 VANDENPLAS, Y. Lactose intolerance. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.24,
733 n.1, p.9-13, 2015.
- 734 VARSHNEY, J. P.; NARESH, R. Comparative efficacy of homeopathic and allopathic
735 systems of medicine in the management of clinical mastitis of Indian dairy cows. The Faculty
736 of Homeopathy. **Homeopathy**, v. 94, 81–85, 2005.
- 737 VICENTE, F. et al. Capacity of milk composition to identify the feeding system used to feed
738 dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v.84, p.254-263, 2017.
- 739 VICKERS, A., Clinical trials of homeopathy and placebo: analysis of the scientific debate.
740 **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 6, p. 49–56, 2000.
- 741 VITHOULKAS, G. **Homeopatia: ciência e cura**. São Paulo: Editora Cultrix, 1980. 463p.
- 742 WEAVER, C. M. Should dairy be recommended as part of a healthy vegetarian diet? Point.
743 **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, n.5, p.1634-1637, 2009.
- 744 WELLER, R. F. & BOWLING. P. J. Health status of dairy herds in organic farming. **The**
745 **Veterinary Record**, n. 146, p. 80-81, 2000.
- 746 WINDIG, J. J. et al. The association between somatic cell count patterns and milk production
747 prior to mastitis. **Livestock Production Science**, v. 96, p. 291-299, 2005.
- 748 ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk.
749 Bulletin of IDF, v.345, p.15-18, 2000.
- 750
751

ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO CETEA



**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impactos sobre produção e qualidade de leite quando feito uso de homeopatia para controlar mastite subclínica em vacas leiteiras", protocolada sob o CEUA nº 2000060919 (00 001032), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 13/09/2019.

We certify that the proposal "Impacts on milk yield and quality when homeopathy is used to control subclinical mastitis in dairy cows", utilizing 60 Bovines (60 females), protocol number CEUA 2000060919 (00 001032), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 09/13/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 10/2019 a 07/2020

Área: **Zootecnia**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **3 a 7 anos**

N: **60**

Linhagem: **Holandês**

Peso: **400 a 600 kg**

Local do experimento: **Fazenda comercial no oeste catarinense - provavelmente no município de Guatambu.**

Lages, 13 de setembro de 2019

Ubirajara Maciel da Costa
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

em aberto

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina