



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ

CAMPUS LUIZ MENEGHEL

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GIOVANNA MELATTI BERMAL MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *PUNICA
GRANATUM* LINN. SOBRE BACTÉRIAS DE INTERESSE À
MASTITE BOVINA**

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2014**

GIOVANNA MELATTI BERMAL MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *PUNICA
GRANATUM* LINN. SOBRE BACTÉRIAS DE INTERESSE À
MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz
Meneghel.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Erika Cosendey
Toledo de Mello Peixoto
Co-orientador: Prof. Dr. Leopoldo Sussumu
Matsumoto

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2014

M838a Moreira, Giovanna Melatti Bermal.
Avaliação do Extrato Hidroalcoólico de *Punica granatum*
Linn. sobre Bactérias de Interesse à Mastite Bovina / Giovanna
Melatti Bermal Moreira – Bandeirantes, 2014.
41f.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto
Coorientador: Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual
do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, 2014.
Banca: Dr^ª. Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto, Dr.
Regildo Márcio Gonçalves da Silva, Dr^ª. Luciana Pereira Silva

1. Atividade antibacteriana. 2. Mastite bovina. 3.
Fitoterápicos. 4. Plantas medicinais. 5. Romã. I. Universidade
Estadual do Norte do Paraná. III. Título.

CDD 581.634

GIOVANNA MELATTI BERMAL MOREIRA

AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *PUNICA GRANATUM* LINN. SOBRE BACTÉRIAS DE INTERESSE À MASTITE BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Aprovada em: 07/ 08/ 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof ^a . Dr ^a . Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto	UENP
Prof ^a . Dr ^a . Luciana Pereira Silva	FEMA
Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva	UNESP
Prof ^a . Dr ^a . Thais Helena Constantino Patelli	UENP
Prof ^a . Dr. Marcelo Alves da Silva	UENP

Prof^a. Dr^a. Erika Cosendey Toledo de Mello
Peixoto
Orientadora
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Mengehel

DEDICATÓRIA

Dedico este Mestrado aos meus pais, Dirlei e Bernal pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e principalmente a Deus, por permitir todas as vivências neste planeta, com todo o amparo necessário para que caminhemos com dignidade e proteção;

Aos meus pais, José Aparecido Bermal Moreira e Dirlei Melatti Bermal Moreira, por me apoiar e incentivar nos momentos difíceis, pelo amor e carinho incondicional, e por serem grandes responsáveis pelo que sou hoje.

Aos meus irmãos e cúmplices, Ricardo Melatti Bermal Moreira e Fernando Melatti Bermal Moreira, pelo amor e apoio concedidos.

Aos meus especiais orientadores Prof^a. Dr^a. Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto e ao Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto, pela paciência, dedicação, persistência e amizade. Pessoas ímpares, que pelo exemplo, me ensinaram a me tornar um ser humano melhor. Levo comigo a admiração, o apreço e o respeito que sinto por vocês.

À Maria Imacula da Silva, do Departamento de Patologia, do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), *Campus* Luiz Meneghel, pelo auxílio, parceria e amizade em todos os momentos;

À equipe e ao Prof^o Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva do Laboratório de Fitoterápicos, do Departamento de Biotecnologia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Assis, que disponibilizou o espaço laboratorial, os equipamentos, regentes, entre outros, viabilizando e contribuindo para a realização deste trabalho;

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Agronomia, pelo apoio e pelos ensinamentos ministrados, que ajudaram na minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos Ministérios MCTI, MDA, MAPA, MPA e MEC pelo apoio financeiro essencial para a realização deste trabalho.

"Quando o homem aprender a respeitar até o
menor ser da criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu
semelhante."

Albert Schweitzer
(Nobel da Paz - 1952)

MOREIRA, Giovanna Melatti Bermal. **Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* linn. sobre bactérias de interesse à mastite bovina.** 2014. 42 folhas. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2014.

RESUMO

Mastite bovina é caracterizada pela inflamação da glândula mamária, geralmente em decorrência à infecção bacteriana, comprometendo a quantidade e qualidade da produção leiteira. Este estudo objetivou verificar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da romã sobre cepas padrão de interesse à mastite bovina. As colônias foram ressuspensas e ajustadas na concentração de 10^7 mL⁻¹ por espectrofotometria UV visível. Os extratos foram avaliados em quintuplicata, em sete concentrações: de 1000 mg mL⁻¹ até 25 mg mL⁻¹. Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. serovar *Typhi* ATCC 19214, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 e isolados de leite bovino. A sensibilidade das cepas foram determinada utilizando a concentração inibitória mínima e o teste de difusão em disco e os resultados que apresentaram zonas de inibição correspondentes a valores a partir de 15 mm nos isolados e para as cepas aqueles que apresentaram halos de inibição, foram considerados sensíveis. Para avaliação fitoquímica foi determinada atividade antioxidante, teores de fenóis e flavonoides totais. Para tanto, o extrato foi diluído em sete concentrações: de 25 a 1000 µg mL⁻¹, e avaliado em triplicata. O crescimento bacteriano foi inibido a partir da concentração de 4 mg.mL⁻¹ para os isolados e para as cepas na concentração de 1000 mg.mL⁻¹ e a ação antioxidante foi verificada a partir de 50 µg mL⁻¹, com valores correspondentes a 4,62%, atingindo platô de 64,90% na concentração de 500 µg mL⁻¹. Na avaliação da atividade captadora de radicais, empregando o radical livre DPPH, o extrato demonstrou atividade antioxidante (IC₅₀= 378,80 µg mL⁻¹). Porém, não foi possível correlacionar a atividade antioxidante aos teores de fenóis e flavonoides. Talvez a presença de outras substâncias alcaloides e taninos presentes no extrato, possam ter sido as responsáveis pela atividade antioxidante encontrada. O extrato foi capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias, exceto *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. serovar *Typhi* ATCC 19214, todas obtiveram os mesmos resultados tanto no teste de difusão em disco como na CIM. Dessa forma as atividades antioxidante e antibacteriana do EHPG 10% pode representar importante potencial terapêutico, particularmente para sanidade animal em sistemas agroecológicos e orgânicos de produção, onde o uso de antibióticos químicos é vetado. Conclui-se que o extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. apresenta atividade antimicrobiana, demonstrando potencial benefício para o controle da mastite bovina.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Mastite bovina. Fitoterápicos. Plantas medicinais. Romã.

MOREIRA, Giovanna Melatti Bermal Moreira. **Evaluation of alcoholic extract *Punica granatum* Linn. on bacteria of interest to bovine mastitis.** 2014. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2014.

ABSTRACT

Bovine mastitis is characterized by inflammation of the mammary gland, usually due to bacterial infection, compromising quantity and quality of milk production. This study aimed to determine the antibacterial activity *in vitro* of the hydroalcoholic extract of the bark of the pomegranate fruit on standard strains of interest the bovine mastitis. The colonies were resuspended and adjusted at a concentration of 10^7 mL⁻¹ UV-visible spectrophotometry. The extracts were evaluated in five replications in seven concentrations: 1000 mg mL⁻¹ to 25 mg mL⁻¹. Were used strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. serovar *Typhi* ATCC 19214, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355 and *Bacillus cereus* ATCC 33018. Sensitivity of the strains were determined using the minimum inhibitory concentration and disk diffusion test and the results showed that the inhibition zones corresponding to values from 15 mm were considered sensitive. For phytochemical evaluation was determined levels of antioxidant activity, total phenols and flavonoids. Thus, the extract was diluted in seven concentrations: 25 the 1000 mg L⁻¹, and evaluated in triplicate. Bacterial growth was inhibited at concentrations of 100 mg mL⁻¹ and the antioxidant activity was observed from 50 mg mL⁻¹, with values corresponding to 4,62% to 64,90% plateau at a concentration of 500 mg mL⁻¹. In the evaluation of radical scavenging activity, using the free radical DPPH, the extract demonstrated antioxidant activity (IC₅₀% = 378,80 µg L⁻¹). However, it has not been possible to correlate the levels of antioxidant activity at levels of phenols and flavonoids. Perhaps the presence of other substances alkaloids and tannins present in the extracts may have been responsible for the antioxidant activity found. The extract was able to inhibit the growth at concentrations of 500 and 1000 mg mL⁻¹ except *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. serovar *Typhi* ATCC 19214, all strains had the same results in both the disk diffusion test as in CIM. That way the antioxidant and antibacterial activities of EHPG 10% may represent important therapeutic potential, particularly for animal health in organic and agroecological production systems, where the use of chemical antibiotics is vetoed. It is concluded that the hydroalcoholic extract of *Punica granatum* Linn. has antimicrobial activity, demonstrating potential benefit for the control of bovine mastitis.

Key-words: Antibacterial activity. Bovine mastitis. Phytotherapics. Medicinal plants. Pomegranate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Mastite.....	3
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.3 Plantas Medicinais	5
2.3.1 <i>Punica granatum</i> Linn.....	6
3 ARTIGO A: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>PUNICA GRANATUM</i> LINN. SOBRE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADOS DE LEITE BOVINO	
3.1 Resumo e Abstract.....	9
3.2 Introdução.....	10
3.3 Material e Métodos	12
3.4 Resultados.....	16
3.5 Discussão.....	17
3.6 Conclusão... ..	21
4 ARTIGO B: AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>PUNICA GRANATUM</i> LINN. SOBRE BACTÉRIAS DE INTERESSE À MASTITE BOVINA	
4.1 Resumo e Abstract.....	22
4.2 Introdução.....	23
4.3 Material e Métodos	24
4.4 Resultados e Discussão	25
4.5 Conclusões.....	28
5 CONCLUSÕES GERAIS	29
REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é considerada a principal afecção da glândula mamária, sendo caracterizada por processo inflamatório frequentemente em resposta à infecção bacteriana. Porém, pode ser causada por outros micro-organismos como micoplasma, fungos, ou algas (Tozzetti et al., 2008). Compromete a qualidade do leite pelo risco de veiculação de agentes patogênicos, causando perdas na produção tanto em propriedades leiteiras como em laticínios (Schvarz e Santos, 2012). Representa um dos fatores que mais reduz a qualidade e a quantidade do produto, afetando a produção nacional e internacional (Costa, 1998). As alterações na composição do leite causam queda no rendimento industrial, prejudicando assim a fabricação de derivados (Holanda Junior, et al. 2005).

A mastite pode ser categorizada em duas formas de acordo com a intensidade da resposta inflamatória: mastites clínicas e subclínicas, sendo esta última apresentada em maior ocorrência (Krewer et al., 2013). Quartos mamários portadores de mastite subclínica diminuem a produção em média entre 25 a 42% (Brito e Brito, 1998). Entretanto, foram registrados valores entre 20 e 71% nos estados de Minas Gerais e São Paulo, respectivamente (Ribeiro Junior et al., 2008). Independentemente da forma, a etiologia bacteriana assume lugar de destaque na epidemiologia do processo infeccioso. Os micro-organismos causadores são variados, mas algumas espécies têm se destacado como o *Staphylococcus aureus*, na forma subclínica (Colombo et al., 2012).

O excessivo uso de antimicrobianos sem a devida presença de testes preliminares de sensibilidade, resulta em tratamentos inadequados, persistência e agravamento da doença, além de resistência microbiana. *Staphylococcus aureus* possui a capacidade de sobrevivência intracelular, assim o medicamento não atinge o foco da infecção (Silva et al., 2012b).

No tratamento usado com antimicrobianos químicos podem causar riscos, por determinar resíduos químicos no leite, tornando-se assim, inapropriado para o consumo (Vieira et al., 2012). Devido à crescente busca por medicamentos naturais, o incentivo ao uso de fitoterápicos se tornou uma alternativa para o combate das enfermidades.

O uso de plantas medicinais já fazem parte da cultura popular, nas últimas décadas o interesse pela Fitoterapia tem sido estimulada entre os usuários, pesquisadores e serviços de saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais ou preparações destas nos cuidados básicos de saúde, desde então, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (Souza et al., 2013).

A utilização de fitoterápicos e plantas medicinais contribui para exploração pecuária sustentável, por não determinar descarte de leite, minimizar a compra de produtos químicos, favorecendo assim a renda do produtor (Domingues et al., 2012; Guimarães et al., 2013). Alguns extratos vegetais ganharam destaque na Medicina Veterinária para tratamentos de parasitoses e infecções, inclusive em tratamentos de mastite bovina (Sperotto et al., 2012).

Punica granatum Linn. tem se destacado popularmente como uma planta medicinal frequentemente usada para afecções como laringite e faringite (Lorenzi e Matos, 2008). Suas propriedades biológicas são amplamente estudadas como a ação antibacteriana, anti-inflamatória e além de ser imunomoduladora (Pereira et al, 2006; Toklu et al., 2007; Werkman et al., 2008; Larrosa et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Moorthy et al., 2013).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn., *in vitro*, sobre *Staphylococcus aureus* e outras bactérias de interesse a mastite bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MASTITE

A mastite também pode ser classificada conforme sua apresentação clínica. Na mastite clínica percebe-se alterações físicas do úbere como edema e o animal pode apresentar febre e anorexia. Ocorrem alterações no leite, como um aspecto aquoso, presença de grumos e pus. Na mastite subclínica os sinais clínicos são imperceptíveis (Ribeiro Júnior e Beloti, 2012). A forma subclínica pode evoluir para a forma clínica ou pode ter remissão espontânea, e em muitos casos pode persistir. Sendo assim, a mastite subclínica, se apresenta como gerador de impacto na produtividade, pela sua maior ocorrência (Fontana et al., 2010; Langoni, 2013).

A forma subclínica pode ocorrer devido a presença de *Staphylococcus aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* (Mello-Peixoto et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Saeki et al., 2011), e a forma clínica é frequentemente correlacionada à presença de enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*), *Nocardia* spp., (*Pseudomonas aeruginosa*); havendo menor incidência de outros micro-organismos como algas (*Prototheca zopfii*), fungos e leveduras (Colombo et al., 2012; Krewer et al., 2013).

A profilaxia é primordial e depende de fatores relacionados ao bem estar do animal, ao meio ambiente e ao manejo dos rebanhos (Figueiredo et al., 2012). A higienização é fundamental para manutenção e promoção na melhoria da qualidade do leite (Oliveira et al., 2011).

A infecção microbiana pode ocorrer pela presença dos micro-organismos no úbere; ou pelo simples contato com utensílios e equipamentos contaminados durante a ordenha (Ribeiro Junior e Beloti, 2012). O ser humano tem papel importante tanto como reservatório e veiculador de agentes microbianos como o *S. aureus* (Cavalcante et al., 2013).

Outro fator a ser considerado, refere-se ao melhoramento genético desenvolvido nas raças leiteiras nos últimos anos. Observa-se que o aumento na produção de leite tem correlação genética entre a incidência de mastite clínica e a produção de leite (Cadavid, 2009). Animais com alto valor genético, para produção de leite, tendem a apresentar mais casos de mastite. Este aumento na incidência de mastite pode ser esperado acompanhado da diminuição de resistência imunológica

desses animais (Cadavid, 2009). Assim, a seleção de animais mais resistentes deve ser considerada, podendo desempenhar importante contribuição para prevenção desta enfermidade (Costa, 1998).

2.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, que são bactérias Gram positivas, imóveis, agrupadas em massas irregulares ou em forma de cachos de uva, aeróbias ou anaeróbias facultativas. São β -hemolíticos, fermentadores de manitol, e apresentam positividade para os testes das enzimas catalase, coagulase (Nader, 2010).

Staphylococcus aureus são os micro-organismos mais encontrados do gênero, apresentando alta ocorrência em rebanhos bovinos nacionais e internacionais (Bandeira et al., 2013; Guimarães et al., 2013). Saeki et al. (2011) relataram ocorrência de mastite subclínica de 60,32% em rebanhos avaliados no Norte do Paraná. Pesquisas recentes demonstram que este micro-organismo está envolvido como principal causador da mastite em outros mamíferos de interesse pecuário como búfalas, cabras e ovelhas (Cavalcante et al., 2013; Lazzari, 2013; Souza et al., 2013).

Estes micro-organismos formam biofilmes em tecidos infectados, protegendo-os da ação fagocitária do sistema imunológico, contribuindo provavelmente para sua alta prevalência e resistência aos antimicrobianos químicos utilizados (Fontana et al., 2010; Marques et al., 2013). Além de prejudicar a resposta imunológica dos animais e favorecer a persistente a mastite subclínica. Raza et al. (2013) relataram que 85% a 98,9% das estirpes, por eles avaliadas, produziram este biofilme. Silva et al. (2012a) considerou ainda a formação de abscessos na glândula mamária que dificultam o processo de cura e diminuem a produção leiteira.

Adicionalmente, os *S. aureus* podem representar risco de intoxicações em humanos, devido à ingestão de toxinas formadas no leite contaminado. As enterotoxinas estafilocócicas produzidas entre 10 e 46°C, tem elevada resistência térmica que resiste ao cozimento e ao leite pasteurizado (Seridan et al., 2012; Ornelas et al., 2013). Cabe ressaltar que mesmo sendo classificados

como micro-organismos mesófilos, os *S. aureus* demonstram crescimento em temperaturas entre 7,0 e 47,8°C (Nader, 2010).

2.3. PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas na medicina tradicional para a promoção e manutenção da saúde, é utilizado pelo homem à séculos, desde a antiguidade até os tempos modernos. Egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos e chineses utilizavam esse tipo de medicina. Eram utilizadas por diferentes motivos, normalmente para combater enfermidades, na forma de cataplasmas, chás, decoctos, inserção de pós, defumadouros, tinturas, entre outros (Alves, 2013).

A Organização Mundial de Saúde define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (WHO, 2002). Investigações etnofarmacológicas contribuíram para a identificação dessas substâncias vegetais passíveis de serem utilizadas como medicamentos naturais (Lima et al., 2013; Zucchi et al., 2013).

Devido à biodiversidade e seus benefícios terapêuticos, o uso de plantas medicinais tem se destacado nos últimos anos (Souza et al., 2012), inclusive como terapia complementar ao tratamento convencional de enfermidades (Valente, 2011). Nos Estados Unidos, houve aumento na utilização da fitoterapia, superior a 50% no período de 1997 a 2002 (Saraiva, 2012).

Adicionalmente, o acesso às plantas medicinais é facilitado conforme a oferta e adaptabilidade da planta de cada região do país. Este aspecto e o baixo custo determinam incentivo ao uso de plantas medicinais (Holz et al., 2013). Conforme a Organização Mundial de Saúde, a frequência do uso de plantas medicinais pode atingir valores equivalentes à 80%, principalmente em países em desenvolvimento, em áreas rurais, ou locais onde a população tem dificuldade de acesso aos medicamentos químicos (Brasil, 2006b). Em 2002, a OMS criou um plano para incentivar o uso da medicina alternativa. Determinou-se metas de criação de políticas públicas para o incentivo aos programas de aplicação nos Sistemas Nacionais de Atenção à Saúde (WHO, 2002).

Foi estabelecida no Brasil, conforme a intenção da OMS, a política para o uso de plantas medicinais no serviço público. A Portaria nº. 971, de 03 de maio de 2006 aprovou, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde – SUS (Brasil, 2006a). Por meio de Decreto nº. 5813, de 22 junho de 2006 foi estabelecida a Política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (Brasil, 2006b). O Ministério da Saúde criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que contém 71 espécies vegetais amplamente utilizadas pela população no território brasileiro. Dentre essas plantas incluem-se romã, alho, picão preto, entre outras. Esta lista contribui para orientar estudos e pesquisas que possam contribuir para a utilização dessas plantas medicinais (Brasil, 2009).

2.3.1. *Punica granatum* Linn.

Punica granatum Linn. é uma planta da família Punicaceae, originária do Mediterrâneo e cultivada em regiões de clima tropical e subtropical, é encontrada em regiões da Índia, América, Irã, entre outros (Endo et al., 2010; Park et al., 2010; Kopparapu et al., 2011). Seu fruto, a romã, possui aspecto globoso, contém casca coriácea, amarelada e manchada, com sementes ou bagos de cor rósea (Ferreira et al., 2008). Dentre seus princípios ativos, incluem-se os taninos em grande quantidade (em torno de 22% a 25% de ácido punicotânico), compostos fenólicos como as antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), quercetina, ácidos fenólicos (caféico, catequínico, clorogênico, orto e paracumárico, elágico, gálico e quínico), flavonoides e alcaloides.

A literatura aponta a romã como uma planta com grande potencial fitoterápico, por prevenir e combater várias doenças, principalmente aquelas relacionadas à sua propriedade antimicrobiana e anti-inflamatória (Lee et al., 2010; Ismail et al., 2012). Por apresentar diversas propriedades farmacológicas e terapêuticas que estão distribuídas em diversas partes da planta e devido a isto, têm-se intensificado o estudo das propriedades químicas da romã podendo despertar o interesse por indústrias farmacêuticas e de gêneros alimentícios (Werkman et al., 2008).

Diversas atividades biológicas e terapêuticas foram atribuídas para a romã, dentre essas destaca-se ação antimicrobiana que foi demonstrada por diversos pesquisadores (Oliveira et al., 2010; Hayouni et al., 2011; Rummun et al., 2013).

Michelin et al. (2005) verificaram efetividade do extrato de romã sob *S. aureus* e *Candida albicans*. Pereira et al. (2006) verificaram inibição do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da romã sobre *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

Ferreira et al. (2008) também trabalharam com cascas de romã, porém utilizando extrato aquoso. Da mesma forma, verificaram atividade antibacteriana sobre *Streptococcus pyogenes* revelando Concentração Inibitória Mínima (CIM) na concentração de 35%. Menezes et al. (2008) estudaram extrato etanólico das folhas de romã, relataram CIM na concentração de 10% e observaram inibição de 100% das cepas de *Staphylococcus aureus* de origem humana ambulatorial.

Endo et al. (2010), avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato etanólico da casca de romã, sobre *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, observaram CIM na concentração de 3,9 e 1,9 mg.mL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, o extrato foi testado contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Esses autores demonstraram CIM na concentração de 125 mg mL⁻¹, apenas contra *S. aureus*.

Oliveira et al. (2010) observaram que o extrato glicólico de *Punica granatum* Linn. apresentou atividade inibitória sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. A eliminação de todas as cepas de *S. aureus* foi determinada a partir da concentração 12,5 mg mL⁻¹, para *S. epidermidis* e *S. mutans* a 6,25 mg mL⁻¹ e para as cepas de *Candida* spp. foi de à 25 mg mL⁻¹.

Hayouni et al. (2011) verificaram que o extrato das sementes de romã apresentou atividade antimicrobiana contra diversas espécies de micro-organismos, como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella anatum*, *S. typhimurium*, *S. pneumoniae*; *C. albicans*, *C. glabrata*, *Trichopyton rubrum* e *Aspergillus niger*.

Jain e Nafis (2011) verificaram que o extrato aquoso da casca inibiu o crescimento de *Candida glabrata* e *C. albicans*, com zona de inibição de crescimento entre 24 e 37 mm. George e Harriet (2012) relataram a eficácia da atividade antibacteriana de extratos aquosos e etanólicos da casca de romã contra

Streptococcus mutans, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus* RPU, e *Candida albicans*.

Rummun et al. (2013) utilizaram extrato aquoso da casca de romã que apresentou atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, *S. mitis* e *Lactobacillus acidophilus*.

Moorthy et al. (2013) avaliaram extrato etanólico da casca para avaliar a atividade antimicrobiana contra 21 micro-organismos. O extrato inibiu o crescimento de mais de 95% dos micro-organismos testados, como *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. enterica*, *S. de Brunei*, *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *H. parahaemolyticus*, *S. epidermidis* e *C. albicans*.

Dessa forma, os resultados supracitados, demonstraram a eficácia da atividade antimicrobiana de *Punica granatum* Linn., a partir de diferentes meios de extração, utilizando diversas partes da planta ou fruto, justificando assim a execução do presente estudo.

3. ARTIGO A: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *PUNICA GRANATUM* LINN. SOBRE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE LEITE BOVINO

3.1. RESUMO E ABSTRACT

Mastite bovina é caracterizada por inflamação da glândula mamária, geralmente em resposta à infecção bacteriana, compromete quali-quantitativamente a produção leiteira. Este estudo objetivou verificar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca da romã sobre bactérias isoladas de leite bovino. As colônias de *Staphylococcus* spp. foram ressuspensas a escala 6 de MacFarland e ajustada a sua concentração por espectrofotometria UV visível na concentração de 10^6 mL⁻¹. Os extratos foram avaliados em quintuplicata, em sete concentrações: de 4 mg mL⁻¹ até 0,0625 mg mL⁻¹. A sensibilidade dos isolados microbianos foi determinada utilizando o teste de difusão em disco e os resultados que apresentaram zonas de inibição correspondentes a valores a partir de 15 mm, foram considerados sensíveis. Os resultados foram avaliados pelo método ANOVA, teste de Tukey 5%, utilizando o SISVAR 5.3 - DEX/UFLA. Adicionalmente o extrato foi avaliado quanto à atividade antioxidante, teores de fenóis e flavonoides totais. Para tanto o extrato foi diluído em sete concentrações: de 25 a 1000 µg mL⁻¹, e avaliado em triplicata. O crescimento bacteriano foi inibido a partir da concentração de 4 mg mL⁻¹ e a ação antioxidante foi verificada a partir de 50 µg mL⁻¹, com valores correspondentes a 4,62%, atingindo platô de 64,90% na concentração de 500 µg mL⁻¹. Na avaliação da atividade captadora de radicais, empregando o radical livre DPPH, o extrato demonstrou atividade antioxidante (IC₅₀% = 378,80 µg mL⁻¹). Porém, não foi possível correlacionar a atividade antioxidante aos teores de fenóis e flavonoides. Talvez a presença de outras substâncias alcaloides e taninos presentes no extrato, possam ter sido as responsáveis pela atividade antioxidante encontrada. Conclui-se que o extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus* spp., demonstrando potencial benefício para o controle da mastite bovina.

Palavras-chave: Mastite; Antimicrobiano; Extrato natural; Plantas medicinais; Produção orgânica; Romã.

Bovine mastitis is characterized by inflammation of the mammary gland, usually in response to bacterial infection, affecting qualitatively and quantitatively milk production. This study aimed to determine the antibacterial activity *in vitro* of the hydroalcoholic extract of the bark of the pomegranate on bacteria isolated from bovine milk. The colonies of *Staphylococcus* spp. were resuspended in 6 MacFarland scale and adjusted its concentration by UV visible spectrophotometry at a concentration of 10^6 mL^{-1} . The extracts were evaluated in quintuplicate in seven concentrations: from 4 up to $0,0625 \text{ mg mL}^{-1}$. The sensitivity of microbial isolates was determined using the disk diffusion and the results that showed inhibition halos corresponding to values from 15 mm were considered susceptible. The results were evaluated by ANOVA, Tukey test 5% using the SISVAR 5.3-DEX/UFLA. Additionally the extract was assessed as for the antioxidant activity, content of phenols and total flavonoids. The extract was diluted into seven concentrations: 25-1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and evaluated in triplicate. The bacterial growth was inhibited starting from the concentration of 4 mg mL^{-1} and antioxidant activity was observed from $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, with values corresponding to 4,62% reaching the plateau of 64,90% at a concentration of $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. In evaluating the radical scavenging activity, using the free radical DPPH, the extract demonstrated antioxidant activity ($\text{IC}_{50\%} = 378,80 \mu\text{g mL}^{-1}$). However it has not been possible to correlate the antioxidant activity with the levels of phenols and flavonoids. Perhaps the presence of other substances alkaloids and tannins present in the extracts may have been responsible for the antioxidant activity found. It was concluded that the hydroalcoholic extract of *Punica granatum* Linn. has antimicrobial activity against *Staphylococcus* spp., demonstrating potential benefit for the control of bovine mastitis.

Key words: Mastitis; Antimicrobial; Natural extract; Medicinal plants; Organic production; Pomegranate.

3.2. INTRODUÇÃO

Mastite bovina é uma doença multifatorial, caracterizada por

inflamação da glândula mamária, frequentemente em resposta à infecção bacteriana, podendo ser causada por outros micro-organismos como algas e fungos (Tozzetti et al., 2008). Em virtude desta infecção, o risco de agentes patogênicos é eminente, uma vez que o leite produzido por animais portadores de mastite apresenta potencial de contaminação por abrigar elevado número de micro-organismos (Ruegg, 2003). Além disso, ocasiona prejuízos ao produtor e laticínios, gerando gastos excessivos com medicamentos, mão-de-obra qualificada e serviços veterinários, além da redução da qualidade e quantidade do leite produzido (Feßler et al., 2012; Langoni, 2013).

A forma subclínica é principalmente transmitida durante a ordenha por patógenos adaptados à glândula mamária, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (Oliveira et al., 2011; Saeki et al., 2011; Mello-Peixoto et al., 2012).

Esses micro-organismos são disseminados principalmente pelas mãos dos ordenhadores e pelas teteiras contaminadas (Colombo et al., 2012; Raza et al., 2013). *S. aureus* é frequentemente incriminado como principal agente etiológico na mastite bovina (Marques et al., 2013; Ondiek et al., 2013). É a espécie mais virulenta dos *Staphylococcus* spp., devido à formação de toxinas, enzimas mediadoras de invasão tecidual, e sobrevivência no sítio da infecção devido à formação de biofilmes (Raza et al., 2013).

Manejo adequado, higienização na ordenha e antissepsia dos tetos, são medidas que contribuem profilaticamente para amenizar o problema (Haftu et al., 2012; Langoni, 2013). A imersão de tetos em antissépticos pode reduzir novas infecções em 50 a 90% (Pedrini e Margatho, 2003).

O tratamento da forma clínica é à base de antimicrobianos químicos, entretanto, seu uso na lactação, no controle da mastite subclínica é pouco frequente entre os produtores, principalmente pela baixa eficácia e necessidade de descarte do leite pela presença de resíduos de antibióticos (Brasil, 2002). Dessa forma, determinou-se a busca por soluções que trate do problema sem gerar descarte do produto. A tendência de exigência de alto padrão de qualidade da produção do leite e seus derivados, determina cada vez mais a busca por alternativas naturais de tratamento (Trevisan et al., 2009). A utilização de extratos de ervas medicinais tem sido encorajada nas diversas atividades da agropecuária (Souza et al., 2013).

Nos últimos anos, o aumento pela procura de produtos orgânicos vem se intensificando. A utilização de plantas medicinais vem cada vez mais sendo

estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por ser acessível economicamente a grande parte da população. Em torno de 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza deste tipo de medicamento (Galdino et al., 2012; Souza et al., 2013).

Punica granatum Linn., conhecida como romãzeira, espécie da família Punicaceae, é cultivada mundialmente (Rummun et al., 2013). Foram demonstradas propriedades antimicrobianas do extrato de *Punica granatum* Lin. (Jain e Nafis, 2011; Almeida et al., 2012; Moorthy et al., 2013; Rajan et al., 2013), inclusive sobre isolados de *S. aureus* (Menezes et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Hayouni et al., 2011; Moorthy et al., 2013).

Os principais constituintes da romã são alcaloides (peletierina, isopeletierina, metilpeletierina), taninos, compostos fenólicos (antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos) e flavonoides (Lansky e Newman, 2007), substâncias frequentemente relacionadas como aquelas responsáveis pelas atividades terapêuticas. Propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias apresentadas pelos extratos de romã são particularmente importantes para o tratamento da mastite bovina (Lee et al., 2010; Ismail et al., 2012).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da romã sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de *Punica granatum* Linn. foram colhidos ao final da manhã no município de Bandeirantes - Paraná. Uma amostra do vegetal foi herborizada e identificada no Instituto Florestal de Assis/SP, e uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto sob o número SPSF 40136.

Os frutos foram higienizados com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 0,5%, secos com papel toalha e descascados. As cascas foram acondicionadas em papel Craft® e encaminhadas para secagem em estufa de ventilação forçada de ar a 40°C. Posteriormente, foi realizada maceração manual e pesagem para obtenção do extrato hidroalcoólico das cascas de romã a 10%. Foram utilizados 30 g do material vegetal em 190 mL de álcool P.A. e 80 mL de água

destilada. Após procedeu-se agitação mecânica constante por 24 horas, com posterior filtração à vacuo. A fim de promover melhor aproveitamento do material vegetal, este procedimento foi realizado por três vezes consecutivas, adicionando-se a cada uma delas a mesma solução hidroalcóolica no mesmo volume supracitado. Posteriormente, o extrato foi concentrado por rotaevaporizador, em temperatura de 60°C e secagem em estufa a 37°C por 24 horas. Após, foi procedido congelamento e liofilização.

Para seleção das amostras de leite portadoras de bactérias do gênero *Staphylococcus*, foram analisadas 64 amostras de leite, proveniente de animais em lactação, apresentando reação positiva para o exame Califórnia Mastite Teste. A partir destas amostras as bactérias foram isoladas utilizando meio de cultura seletivo Ágar Baird Parker® enriquecido com emulsão de gema de ovo com telurito. Após incubação a 37°C por 48 horas, observou-se morfologia, coloração e aspectos macroscópicos das colônias bacterianas, como coloração cinza-negra, brilhante, convexa, com zona de precipitação circundada por halo claro de 2-5 mm. Em meio Ágar Sangue, foram observados aspectos quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise.

As colônias isoladas nos meios de culturas foram observadas em lâminas e coradas por técnica de Gram, as colônias de cocos Gram positivas foram identificadas conforme a produção de catalase. As colônias que apresentaram positividade para o teste da catalase, também foram submetidas ao teste de produção de coagulase (Harmon e Langlois, 1989). As colônias identificadas como coagulase negativa foram submetidas a testes de resistência à novobiocina e teste de urease (Schleifer e Kloos, 1975; Baker et al., 1986; Santos et al., 2010). As colônias identificadas foram contadas e determinadas em Log da unidade formadora de colônias por mililitros de leite (LogUFC mL⁻¹).

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizados os seguintes micro-organismos: *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 e os isolados *S. aureus* (SA), *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) e *S. saprophyticus* (SS). Foi utilizado a técnica de difusão em discos, utilizando-se placas de Ágar Mueller-Hinton (CLSI/NCCLS, 2006). As colônias de *Staphylococcus* spp. isoladas foram ressuspensas em solução salina 0,85% estéril na concentração de 6 na escala de MacFarland e ajustada a concentração de 10⁶ UFC mL⁻¹ por espectrofotometria de luz, em comprimento de onda de 600 nm com absorbância de 0,40 a 0,49. Após a secagem, os discos foram fixados sobre o meio Ágar Mueller-

Hinton previamente semeado com auxílio de suabe estéril pelos inóculos bacterianos (Pinto et al., 2001). Como controle negativo utilizou-se papel filtro embebido com água destilada estéril. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas e as análises foram realizadas em quintuplicata.

O extrato liofilizado foi ressuspendido em água destilada estéril na concentração inicial de 4 mg mL⁻¹, e a partir desta solução foram realizadas as seguintes diluições: 2 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹, 0,25 mg mL⁻¹, 0,125 mg mL⁻¹, 0,0625 mg mL⁻¹. Subsequentemente uma alíquota 40 µL de cada extrato foi impregnada em discos de papel filtro (Whatman nº 1), de 7 mm de diâmetro (Pereira et al., 2009).

A sensibilidade dos isolados microbianos foi determinada utilizando o teste de difusão em disco e os resultados que apresentaram zonas de inibição correspondentes a valores a partir de 15 mm, foram considerados sensíveis. Esses halos foram medidos em milímetros (mm) em relação ao seu diâmetro, com auxílio de régua milimetrada. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Barbosa e Vieira, 2011; Barros et al., 2011).

Como padrão de comparação da eficiência dos extratos foram realizados testes de sensibilidade aos fármacos químicos rotineiramente utilizados na clínica veterinária, tais como: ampicilina (10 µg), sulfametoxazol e trimetoprim (25 mg), penicilina (10 µg), oxacilina (1 µg) e tetraciclina (30 µg) (Pereira et al., 2009). Em relação aos aspectos fitoquímicos, o extrato hidroalcoólico das cascas do fruto de *Punica granatum* Linn., foi avaliado quanto à atividade antioxidante, teores de fenóis e flavonoides totais. Para realização dessas determinações, o extrato foi diluído nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 µg para cada 1 mL, e avaliados em triplicata.

A atividade antioxidante (AA%) do extrato foi determinada pela capacidade doadora de H⁺ para o radical estável DPPH. (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com a metodologia *in vitro* proposta por Blois (1958). Este método é baseado na redução do radical livre estável DPPH de coloração violeta à DPPH, de coloração amarelada. O teste detecta baixas concentrações dos princípios ativos (Manian et al., 2008). O extrato reage com o radical DPPH em ambiente de pouca luminosidade, em seguida é submetido ao espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-Vis) a um comprimento de onda de 517 nm. (Brand-Williams et al., 1995). O cálculo

da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a fórmula: Atividade antioxidante (%) = $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$ onde A_{amostra} é a absorbância das amostras após 30 minutos e A_{controle} é a absorbância do DPPH; ambos a 517 nm. O teste é sensível para detectar baixas concentrações dos princípios ativos (Manian et al., 2008), e o resultado pode ser visualizado pelo grau de descoloração do reagente após os 30 minutos necessários para a reação atingir o estado de platô. A determinação da IC_{50} , ou seja, concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH, foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para o teste DPPH (Di Mambro e Fonseca, 2005).

Para determinação de fenóis totais, o método utilizado foi o de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico), utilizando ácido gálico como padrão de comparação. A cada 0,5 mL de extrato, foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 minutos, foi adicionado 1 mL de solução de Na_2CO_3 saturada a 10%, e a mistura armazenada por 1 hora. A absorbância foi medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g de extrato. O ácido gálico é precursor de diversos tipos de compostos fenólicos, possui estrutura simples, e por este motivo é considerado substância de escolha como padrão.

A dosagem dos flavonoides totais do extrato foi determinada por espectrofotômetro UV-Vis. As amostras foram preparadas segundo a metodologia de Zhishen et al. (1999), baseado na complexação dos flavonoides com $AlCl_3$, ocorrendo deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. Uma alíquota de 250 μ L dos extratos foi adicionada a 1,25 mL de água destilada e 75 μ L de solução de $NaNO_2$ a 5%. Após 6 minutos, 150 μ L de solução de $AlCl_3/H_2O$ a 10% foi adicionada. Após 5 minutos, 0,5 mL de solução de NaOH 1M foi adicionada, e então o volume total completado com 2,5 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vórtex e a absorbância mensurada a 510 nm. Os resultados foram expressos em mg de rutina por g de extrato. A rutina, assim como a quercetina, apresenta estrutura básica de flavonoides, podendo ser empregada como indicador indireto para este grupo de compostos.

3.4. RESULTADO

Para as amostras de leite utilizadas pelo presente estudo, foram identificados 13 isolados de *Staphylococcus aureus*, 2 isolados de *S. coagulase negativa* e 3 isolados de *S. saprophyticus* (1, 2 e 3).

Em relação aos resultados referentes à técnica de difusão em discos, o extrato hidroalcoólico de romã a 10% apresentou atividade antibacteriana. Todos os isolados e as bactérias de referência apresentaram halo de inibição superior que 15 mm; a partir da concentração de 0,125 mg mL⁻¹ (Quadro 1); ao contrário o grupo controle negativo que não apresentou ação inibitória, tão pouco interferência no crescimento microbiano.

Quadro 1. Halos de inibição (mm) de crescimento dos *Staphylococcus* spp. referência (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305) e isolados (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus saprophyticus* isolados 1, 2 e 3), submetidos às diferentes concentrações de extrato aquoso de *Punica granatum* Linn. a 10%

Extrato mg mL ⁻¹	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S.</i> <i>saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>S.</i> coagulase negativa	<i>S. saprophyticus</i>		
					1	2	3
4	30.3	31.0	32,7 ^a	32,7 ^a	29,7 ^a	23,7 ^{bcd}	37,0 ^a
2	25.7	29.3	27,7 ^b	31,3 ^{ab}	27,7 ^a	22,3 ^{cd}	35,3 ^a
1	22.2	24.0	26,3 ^{bc}	30,7 ^{ab}	25,3 ^b	26,7 ^a	30,7 ^b
0,5	21.5	21.6	25,7 ^c	28,0 ^b	24,0 ^{bc}	25,0 ^{ab}	27,3 ^c
0,25	17.6	21.7	22,0 ^d	27,7 ^{bc}	23,0 ^c	24,3 ^{abc}	24,3 ^d
0,125	16.0	20.8	21,3 ^d	23,3 ^c	18,0 ^d	21,7 ^d	24,3 ^d
0,0625	15.3	17.1	16,3 ^e	9,3 ^d	10,0 ^e	17,3 ^e	16,0 ^e

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em relação à sensibilidade aos antibióticos químicos testados, todos *Staphylococcus* spp. apresentaram sensibilidade, com exceção do *S. aureus* ATCC 25923, que apresentou resistência à tetraciclina. Da mesma forma, todos os isolados de *S. saprophyticus* foram resistentes à tetraciclina (Quadro 2).

Quadro 2. Halos de inibição (mm) de crescimento dos *Staphylococcus* spp. referência (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305) e isolados (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus saprophyticus* isolados 1, 2 e 3), submetidos aos fármacos químicos

Antibióticos ^a	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S.</i> <i>saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>S.</i> coagulase negativa	<i>S. saprophyticus</i>		
					1	2	3
AMP 10	38.0	36.0	32	30	36	32	30
SUT 25	32.0	36.0	30	32	31	28	31
OXA 1	31.0	19.0	28	18	18	19	21
PEN 10	43.0	35.0	40	31	30	35	29
TET 30	12.0 ^b	33.0	25	26	11 ^b	11 ^b	11 ^b

Antibióticos ^a: AMP 10 (Ampicilina 10 µg); SUT (Sulfametoxazol + Trimetropim 23,75 µg/1,25 µg); OXA (Oxacilina 1 µg); PEN 10 (Penicilina 10 un); TET 30 (Tetraciclina 30 µg) (CLSI, 2011)
Classificação da sensibilidade ^b: Resistente

O extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. apresentou atividade antioxidante a partir da concentração de 50 µg mL⁻¹, com valores correspondentes a 4,62%, atingindo 64,90% na concentração de 500 µg mL⁻¹. O extrato apresentou alta atividade antioxidante com IC₅₀% correspondendo a 378,80 µg mL⁻¹. As outras concentrações utilizadas nesta análise também apresentaram atividade (Quadro 3), entretanto, a atividade antioxidante não foi correlacionada aos teores de fenóis totais e flavonoides.

Quadro 3. Valores médios referentes à atividade antioxidante (AA%) para as diferentes concentrações em µg mL⁻¹ do Extrato Hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn.

Concentração µg mL ⁻¹	(AA%)
25	0
50	4,62
75	4,42
100	32,99
250	35,59
500	64,90
1000	78,35

3.5. DISCUSSÃO

Em referência aos micro-organismos causadores de mastite bovina,

Staphylococcus aureus destaca-se como principal agente etiológico da forma subclínica da doença (Ribeiro et al., 2009; Saeki et al., 2011; Mello-Peixoto et al., 2012; Marques et al., 2013). Esta espécie é considerada a mais virulenta do gênero *Staphylococcus*, devido à formação de toxinas, enzimas mediadoras de invasão tecidual, e sobrevivência no sítio da infecção devido à formação de biofilmes (Raza et al., 2013). Dessa forma, *S. aureus* pode causar infecções de longa duração com tendência para cronicidade, apresentando baixas taxas de cura (Sabour et al., 2004). Estes fatores, quando analisados conjuntamente com a necessidade de descarte do leite, pela presença de resíduos de antimicrobianos químicos, dificultam a intervenção terapêutica durante a lactação.

Entretanto, o não tratamento da mastite tem sido reavaliado, pois o dano tecidual à glândula mamária é mínimo e reversível durante os estágios iniciais de infecção por *S. aureus* e, se efetivamente tratado neste período, o quarto mamário retornará à produção próxima da normal nas lactações seguintes (Nickerson, 1993). Assim, a avaliação de terapêuticas naturais se justifica, principalmente pela possibilidade de se demonstrar potencial benefício para o controle da mastite bovina. Os resultados deste estudo confirmam a eficácia do extrato de romã como potencial agente antibacteriano sobre *S. aureus*, corroborando aos resultados registrados por Catão et al. (2006), Pereira et al. (2006), Silva et al. (2008), Saeki et al. (2011), Moorthy et al. (2013) e Silva et al. (2013).

Catão et al. (2006) compararam a eficiência de antimicrobianos usados rotineiramente na clínica médica aos resultados apresentados pelo extrato etanólico de romã a 10%. Avaliaram 17 cepas de *S. aureus* de origem humana ambulatorial e registraram que o extrato de romã foi capaz de inibir 100% das cepas analisadas, enquanto que 64,7% apresentaram resistência à penicilina e à ampicilina.

Pereira et al. (2006) avaliaram extrato da casca da romã em biofilme dental, verificando a sensibilidade de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*. Considerando que um dos componentes mais utilizados para antissepsia oral corresponde à clorexidina, esses pesquisadores realizaram os mesmos procedimentos com a clorexidina, e registraram que o extrato de romã apresentou melhores resultados. Silva et al. (2008) também verificaram atividade antimicrobiana do extrato da casca do fruto da romã. Avaliaram 38 cepas de *S. aureus*, sendo que 22 delas eram resistentes à penicilina. Semelhantemente aos resultados encontrados pelo presente

estudo, esses autores observaram halos de inibição variando de 10 a 36 mm de diâmetro.

Em relação aos resultados apresentados pelo teste de difusão em disco, o valor de 15 mm foi selecionado considerando-se que o limite para o controle laboratorial de *S. aureus* (ATCC 25923), para diferentes antibióticos químicos testados, não ultrapassou 15 mm diâmetro. Pereira et al. (2006); Saeki et al. (2011) e Silva et al. (2013) também verificaram halos de inibição maiores que 15 mm. Moorthy et al. (2013) utilizaram teste de difusão em discos para avaliar extrato etanólico da casca de *Punica granatum* Linn. sobre 21 micro-organismos. Avaliaram 250, 500, 750, 1000 e 1250 µg/disco, e verificaram inibição do crescimento de mais de 95% dos micro-organismos testados. Para *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *S. mutans*, os halos de inibição apresentaram valores de 19.2 ± 1.15 , 24.6 ± 0.87 e 16.2 ± 1.31 mm, respectivamente.

Os efeitos do extrato de romã foram testados especificamente contra micro-organismos coletados a partir de animais portadores de mastite bovina (Gopinath et al., 2011; Saeki et al., 2011; Silva et al., 2013). Gopinath et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos de *Cymbopogon citrates*, *Punica granatum* Linn, *Pennisetum setaceum* e *Nerium oleander*. Esses autores concluíram que os extratos de *Cymbopogon citrates* e *Punica granatum* Linn apresentaram atividade antibacteriana, sendo que a maior potência foi observada para o extrato de *Punica granatum* Linn. verificando halos de inibição de 36, 25, 27 e 32 mm para *S. aureus*, *S. uberis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase negativa, respectivamente.

Em relação à sensibilidade frente aos antibióticos químicos, este estudo verificou resultados semelhantes aos encontrados por Fontana et al. (2010), Saraiva (2012) e Moorthy et al. (2013) que obtiveram 100% de inibição das cepas frente aos antibióticos testados.

A atividade antimicrobiana é particularmente importante para o tratamento da mastite bovina, uma vez que esta é frequentemente causada em resposta à infecção bacteriana (Oliveira et al., 2011; Saeki et al., 2011; Mello-Peixoto et al., 2012). Da mesma forma, a avaliação da atividade antioxidante é relevante, principalmente para o controle da forma subclínica da doença, pelo fato de que muitas substâncias naturais obtidas de plantas medicinais têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o organismo dos efeitos

destes, bem como retardando o aparecimento de alterações celulares degenerativas frequentemente presentes em doenças crônicas (Bianchi e Antunes, 1999). Considerando-se que a mastite subclínica rotineiramente é tratada apenas no período de secagem, infectando os animais durante toda lactação, esta forma de apresentação é caracterizada como condição crônica (Sabour et al., 2004), capaz de gerar alterações celulares degenerativas. Assim, se fez relevante para o presente estudo, avaliar a ação antioxidante do extrato de romã. Da mesma forma, a avaliação dos teores de fenóis e flavonoides totais é relevante ao se considerar a capacidade de inibição bacteriana apresentada por estes compostos (Duman et al., 2009; Al-Zahrani, 2012). Fenóis e flavonoides auxiliam na ruptura da membrana plasmática, na desnaturação das proteínas e desativação das enzimas auxiliando na ação antimicrobiana de *Punica granatum* Linn. (Arif et al., 2011).

Assim como o presente estudo Silva et al. (2013) avaliaram extrato de *Punica granatum* Linn. sobre cepas isoladas de *S. aureus* provenientes de animais portadores de mastite bovina subclínica. Porém, esses autores avaliaram extrato aquoso, seco e *in natura*, das folhas e cascas dos frutos. Dentre esses extratos, o extrato seco das cascas de romã apresentou os melhores resultados, e bastante semelhantes aos encontrados neste estudo. Porém, apesar desta alta atividade antioxidante encontrada, a mesma não pôde ser correlacionada aos teores de fenóis e flavonoides totais.

Manasathien et al. (2012) avaliaram extrato etanólico e aquoso da casca do fruto. Para fenóis totais determinaram os valores de 449,60 GAE.mg⁻¹ e 380,54 GAE.mg⁻¹ respectivamente. Para os teores flavonoides, esses autores encontraram valores de 38,44 GAE.mg⁻¹ e 26,04 GAE.mg⁻¹ respectivamente. Morais et al. (2013) avaliaram o extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. e relacionaram a atividade antioxidante encontrada ao teor de fenóis totais que correspondeu a 135,89 GAE.mg⁻¹. Rummun et al. (2013) encontraram no extrato metanólico da casca do fruto de romã, valores de fenóis totais de 190,27 GAE.g⁻¹ (ácido gálico equivalente) e de flavonoides de 180,10 QE.g⁻¹ (quercetina equivalente). Esses resultados foram obtidos a partir das mesmas concentrações avaliadas pelo presente estudo, porém a metodologia utilizada para a extração dos princípios ativos foi diferenciada. Talvez este fato seja responsável pela diferença de valores encontrados nas pesquisas supracitadas. *Punica granatum* Linn. apresenta composição química extremamente complexa, com atividade terapêutica específica para cada composto. Talvez outras

substâncias alcaloides presente no extrato estudado, possam ter sido as responsáveis pela atividade antioxidante verificada (Moorthy et al., 2013; Rummun et al., 2013). Machado et al. (2003) e Moorthy et al. (2013) referiram a punicalagina, um tanino elágico derivado do fruto, como um dos principais constituintes antimicrobianos da fruta. Noda et al. (2002) avaliaram extrato acetônico de romã, apontando que para atividade antioxidante, há a contribuição de três antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidine).

De qualquer forma, e a partir da inibição bacteriana verificada, os resultados apresentados pelo presente estudo permitem destacar o potencial terapêutico do extrato de romã para o controle da mastite bovina. Assim, a utilização de produtos naturais, principalmente a confecção de fitoterápicos para o controle da sanidade animal, principalmente para sistemas de produção orgânica ou biológico dinâmica, onde é proibitiva a utilização de medicamentos químicos. Importante destacar que a avaliação do perfil de sensibilidade e de resistência antimicrobiana destes organismos, é primordial à implantação de um sistema de controle eficiente (Chagas et al., 2012; Langoni, 2013). Adicionalmente, Werkman et al. (2008) consideraram que o uso da romãzeira, pode ser realizado de forma simples sem comprometimento das propriedades biológicas, e que estaria em concordância com as recomendações da OMS quanto ao uso de fontes naturais de baixo custo para o tratamento das afecções.

3.6. CONCLUSÃO

O extrato de *Punica granatum* Linn. apresentou ação inibitória sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*, principalmente sobre *S. aureus*, demonstrando potencial benefício para o controle da mastite bovina.

4. ARTIGO B: AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE ROMÃ SOBRE ESPÉCIES DE INTERESSE NA MASTITE BOVINA

4.1. RESUMO E ABSTRACT

Mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária em decorrência à infecção bacteriana, comprometendo a qualidade do leite. Objetivou-se verificar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da romã sobre oito cepas padrão de interesse à mastite bovina. As colônias foram ressuspensas e ajustadas à concentração de 10^7 mL⁻¹ e as concentrações avaliadas dos extratos foram de 1000 µg mL⁻¹ a 25 µg mL⁻¹. Foram avaliadas a atividade antioxidante e teores de fenóis totais nas mesmas concentrações. O extrato nas concentrações de 1000 e 500 µg mL⁻¹ foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de todas as cepas avaliadas pelo presente estudo, exceto *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enterica* (subsp. *serovar Typhi*) ATCC 19214. O crescimento bacteriano foi inibido na concentração de 100 µg mL⁻¹ e a ação antioxidante foi verificada a partir de 50 µg mL⁻¹, com valores correspondentes a 4,62%, atingindo platô de 64,90% na concentração de 500 µg mL⁻¹. O extrato demonstrou atividade antioxidante, apresentando IC₅₀% correspondente à 378,80 µg mL⁻¹, não foi possível correlacionar a atividade antioxidante aos teores de fenóis. Dessa forma, EHPG 10% apresentaram atividades antibacteriana e antioxidante do EHPG 10% sobre bactérias Gram positivas representa importante alternativa no tratamento da mastite bovina.

Palavras-chave: Agroecologia; Extrato vegetal; Mastite; Plantas medicinais; *Punica granatum* Linn.

Bovine mastitis is an inflammation of the mammary gland due to bacterial infection compromising the quality of milk. Aimed to verify the *in vitro* antibacterial activity of the aqueous extract of the bark of the pomegranate fruit on eight standard strains of interest to bovine mastitis. Sensitivity was determined by minimum inhibitory concentration and disk diffusion test. The colonies were adjusted to a concentration of 10^7 mL⁻¹ and the concentrations of the extracts were evaluated 1.000 to 25 µg mL⁻¹. Antioxidant activity and total phenol content in the same concentrations were evaluated. Bacterial growth

was inhibited at a concentration of 1000 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, except for *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Salmonella enterica* (subsp. serovar *Typhi*) (ATCC 19214) and the antioxidant activity was observed from 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with values corresponding to 4.62%, reaching plateau of 64.90% at a concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The extract showed antioxidant activity, with IC50% corresponding to 378.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, it was not possible to correlate the antioxidant activity to levels of phenols. That way, EHPG 10% showed antibacterial and antioxidant activity against Gram positive bacteria.

Key words: Agroecology; Plant extract; Mastitis; Medicinal plants; *Punica granatum* Linn.

4.2. INTRODUÇÃO

Mastite bovina é caracterizada por inflamação e infecção bacteriana da glândula mamária, que determina importante impacto econômico (Feßler et al., 2012). A forma clínica é causada principalmente por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Molina et al., 2013), e a forma subclínica é principalmente causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (Mello-Peixoto et al., 2012). O tratamento é realizado usualmente pelo uso de antimicrobianos químicos, entretanto, durante a lactação o uso desses medicamentos é pouco frequente, principalmente pela baixa eficácia e necessidade de descarte do leite pela presença de resíduos (Brasil, 2002). Dessa forma, determinou-se a busca por soluções que trate do problema sem gerar descarte do produto.

Segundo dados da Associação de Comércio Orgânico houve importante aumento da produção de orgânicos (OTA, 2011), e a pecuária ganhou significativa importância pela sua representatividade com 41,7% na economia dos orgânicos (Mooz e Silva, 2014). A utilização de plantas medicinais vem sendo estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por ser acessível economicamente a grande parte da população, isto considerando que 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza de alguma forma este tipo de medicamento (Souza et al., 2013).

Punica granatum Linn., conhecida como romanzeira, espécie da

família Punicaceae, é cultivada mundialmente (Lorenzi e Matos, 2008). Seus constituintes são alcaloides (peletierina, isopeletierina, metilpeletierina), taninos, compostos fenólicos (antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos) e flavonoides (Lansky e Newman, 2007). Foram demonstradas propriedades antimicrobianas do extrato de romã (Moorthy et al., 2013), inclusive sobre isolados de *S. aureus* (Silva et al., 2013). Propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias apresentadas pelos extratos de romã são particularmente importantes para o tratamento da mastite bovina (Ismail et al., 2012).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de romã sobre bactérias padrão de interesse à mastite bovina.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de romã foram colhidos ao final da manhã no município de Bandeirantes – Paraná, Brasil (posição geográfica 23°07,02' 62"S e 50° 22,06' 75'O). Uma amostra do vegetal foi herborizada, identificada no Instituto Florestal de Assis/SP, e uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto sob o número SPSF 40136.

Os frutos foram higienizados (solução aquosa de hipoclorito de sódio a 0,5%), descascados, e as cascas foram secas em estufa de ventilação forçada de ar à 40°C. Após maceração manual e pesagem foram utilizados 30 g do material vegetal em 190 mL de álcool P.A. e 80 mL de água destilada. Procedeu-se agitação mecânica constante por 24 horas, com posterior filtração à vácuo; este procedimento foi realizado por três vezes consecutivas. Posteriormente, o extrato foi concentrado por rotaevaporizador (temperatura de 60°C), congelado e liofilizado.

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizada técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer (CLSI, 2011). O extrato foi ressuspendido em caldo nutriente na concentração inicial de 1000 µg mL⁻¹, a partir desta diluição foram realizadas as diluições: 500, 250, 100, 75, 50 e 25 µg mL⁻¹. Em câmara de fluxo laminar unidirecional uma alíquota de 40 µL de cada concentração do extrato foi impregnada em discos de papel filtro (7mm), em quintuplicata. Após a secagem, os discos foram fixados sobre placas de Ágar Mueller – Hinton, previamente semeadas

com suabe estéril pelos inócuos fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enterica* (subsp. serovar *Typhi*) (ATCC 19214), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355) e *Bacillus cereus* (ATCC 33018); todos na concentração de 107 UFC mL⁻¹. Procedeu-se incubação em estufa microbiológica a 37°C por 24 a 48h.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) o extrato foi ressuspenso em caldo nutriente, nas concentrações de 1000, 500, 250, 100, 75, 50 e 25 µg mL⁻¹. Procedeu-se inoculação bacteriana (5x10⁵ UFC mL⁻¹), incubação por 20h a 35°C (CLSI, 2011).

Para determinação da atividade antioxidante (AA%) e teores de fenóis totais, o extrato foi diluído nas mesmas concentrações supracitadas, e avaliado em triplicata. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pela capacidade doadora de H⁺ para o radical estável DPPH. (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com a metodologia *in vitro* proposta por Blois (1958). A determinação da concentração da amostra que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH (IC₅₀,) foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias realizadas para o teste DPPH (Di Mambro e Fonseca, 2005).

Para determinação de fenóis totais, o método utilizado foi o de *Folin-Ciocalteu*, utilizando ácido gálico como padrão de comparação. A absorbância foi medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis, e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g de extrato.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O EHPG 10%, nas concentrações 1000 e 500 µg mL⁻¹, demonstrou atividade antimicrobiana para as bactérias Gram positivas, tanto pelo teste de difusão em disco como pelo teste CIM, e na concentração de 250 µg mL⁻¹ apenas para o teste CIM (Tabelas 1, 2). Entretanto, o mesmo não foi observado para as bactérias Gram negativas. Bactérias Gram negativas são mais resistentes aos antimicrobianos à base de extratos naturais que as Gram positivas (Carvalho et al., 2013). Essas possuem

camada externa fosfolipídica impermeável a solutos lipofílicos, e as porinas presentes, formam barreira contra solutos hidrofílicos, restringindo a penetração dos compostos antimicrobianos. Já as Gram positivas possuem apenas parede celular composta por peptidoglicanos, tornando-as mais suscetíveis (Rabêlo et al., 2014).

Tabela 1. Halos de inibição (mm) de crescimento dos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355) e *Bacillus cereus* (ATCC 33018), submetidos às diferentes concentrações de Extrato Hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. à 10%

Extrato $\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018
1000	16,6	17,6	17,6	20,6	11,8	13,6
500	10,2	9,6	-	15,8	-	-

Valores expressos em média.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de crescimento dos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus cereus* (ATCC 33018), submetidos às diferentes concentrações de Extrato Hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. a 10%

Extrato $\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018
1000	I	I	I	I
500	I	I	I	C
250	I	C	C	C

C: Crescimento bacteriano / I: Inibição de crescimento pelo extrato

Corroborando aos resultados registrados (Duman et al., 2009; Moorthy et al., 2013; Moreira et al., 2014) a efetividade antimicrobiana do extrato de romã também foi observada pelo presente estudo. Duman et al. (2009) analisaram seis cultivares de romã, verificando CIM para *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* variando de 30 a 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses autores verificaram correlação positiva entre a

atividade antimicrobiana e os teores de antocianina dos extratos por eles analisados. Moorthy et al. (2013) utilizaram teste de difusão em discos para avaliar extrato etanólico da casca de romã sobre 21 micro-organismos, verificando inibição de mais de 95% desses micro-organismos testados.

Em relação à atividade antioxidante, o presente extrato apresentou valores correspondentes a 4,62% na de concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, atingindo 64,90% na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; com IC50% correspondendo a 378,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3). Para as concentrações avaliadas, não foi constatada presença significativa de compostos fenólicos.

Tabela 3. Porcentagem de atividade antioxidante (AA%), teores de fenóis totais, para o extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. à 10%, nas diferentes concentrações.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	(AA%)	Fenóis Totais (mg EAG.g ⁻¹ de extrato)
1000	77,79	8,29
500	64,01	6,92
250	33,94	5,97
100	31,27	5,88
75	1,96	0,14
50	2,17	-
25	-	-

Valores expressos em média. EAG = Equivalente de ácido gálico.

Silva et al. (2013) também avaliaram extrato confeccionado a partir da casca do fruto da romã. Entretanto, utilizaram extrato aquoso, seco e in natura, e assim como o presente estudo, observaram alta atividade antioxidante, mas a mesma não pôde ser correlacionada aos teores de fenóis e flavonoides totais. A romã apresenta composição química extremamente complexa, com especificidade terapêutica para cada composto presente. Talvez outras substâncias alcaloides presente no extrato estudado, possam ter sido as responsáveis pela atividade antioxidante encontrada (Moorthy et al., 2013; Rummun et al., 2013). Machado et al. (2003) e Moorthy et al. (2013) referiram a punicalagina, um tanino elágico derivado do fruto, é um dos principais constituintes antimicrobianos. Noda et al. (2002) avaliaram extrato acetônico de romã, apontando que para atividade antioxidante, há a contribuição de três antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidine).

Rummun et al. (2013) encontraram no extrato metanólico da casca do

fruto, valor de fenóis totais a 190,27 GAE.g⁻¹. Karaaslan et al. (2014) encontraram no extrato acetônico do fruto de romã, de quatro cultivares, compostos fenólicos de 337,4 a 178 mg.100 g⁻¹. Esses resultados foram obtidos a partir das mesmas concentrações avaliadas neste estudo. Porém a metodologia diferenciada para a extração dos princípios ativos pode ser a responsável pela diferença significativa dos valores encontrados nas pesquisas supracitadas. Vale ressaltar que o local, o período e tipos de solventes utilizados na extração dos princípios ativos podem interferir na atividade biológica do extrato (Melo et al., 2012).

4.4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a inibição de bactérias Gram positiva nos permite concluir que o extrato hidroalcoólico da romã apresentou potencial terapêutico para o controle mastite bovina. Este resultado é particularmente importante para sistemas de produção que não permitem o uso de antibióticos químicos como sistemas agroecológicos, biodinâmicos e orgânicos.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *Punica granatum* Linn. apresentou-se um antimicrobiano eficaz contra bactérias causadoras da mastite bovina, principalmente de mastite subclínica. Dentre essas destaque-se o *Staphylococcus aureus*, principal agente infeccioso desta enfermidade.

O extrato mostrou ação inibitória não somente a *S. aureus* como também a bactérias Gram positivas, demonstrando seu potencial benéfico ao controle de sanidade animal. Mesmo não encontrando valores significativos de compostos fenólicos e flavonoides que justificassem a atividade antioxidante observada justificando a ação antimicrobiana analisada.

Dessa forma e a partir dos resultados encontrados pelo presente estudo pôde-se concluir que o EHPG 10% apresentou atividade antioxidante e antibacteriana e potencial terapêutico importante principalmente para o controle da sanidade animal em sistemas agroecológicos e de produção orgânica, onde o uso de antimicrobianos químicos é proibitivo.

7. REFERÊNCIAS

AL-ZAHRANI, S.H. Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of American Science**, 8:2, 2012.

ALVES, L.F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, 5:450-513, 2013.

ARIF, T.; MANDAL, T.K.; DABUR, R. Natural products: anti – fungal agents derived from plants. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, 81:283-311, 2011.

BAKER, J.S.; HACKETT, M.F.; SIMARD, D.J. Variations in bacitracin susceptibility observed in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, 23:963-964, 1986.

BANDEIRA, F.; PICOLI, T.; ZANI, J.L.; DA SILVA, W.P.; FISCHER, G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, 80:01-06, 2013.

BARBOSA, M.S.; VIEIRA, G.H.D.C. Diagnóstico e prevenção de mastite em vacas leiteiras no município de Cassilândia/MS. In: **Seminário De Extensão Universitária-Semex. Anais...**, p.1-3, 2011.

BARROS, J.D.; SOUZA FILHO, S.; CASTRO, V.; TORRES, V.M.; HIGINO, J.S.; MELO, A.F.M. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e determinação da CL50 do extrato bruto seco da *Vitex agnus castus* Linn. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 7:10, 2011.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, 12:123-130, 1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature** 181:1199-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, 28:25-30, 1995.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 051 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 setembro 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de maio de 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de junho de 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário Terapêutico Nacional: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2009.

BRITO, M.A.V.P. BRITO, J. R.F. **O efeito da mastite no leite**. São Paulo: Tortuga. 1998. 90p.

CADAVID, H.C. **Contagem de células somáticas no leite de búfalas e sua aplicação na seleção para a resistência à mastite**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2009. 89p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal).

CARVALHO, R.S.; ALEIXO, A.A.; CAMARGOS, V.N.; SANTOS, M.; HERRERA, K.M.S.; MAGALHÃES, J.T.; LIMA, L.A.R.S.; FERREIRA, J.M.S. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de *Baccharis trimera* (LESS.) dc (ASTERACEAE) frente as bactérias de importância médica. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2:45-47, 2013.

CAVALCANTE, M.P.; FILHO, F.A.; ALMEIDA, M.G.A.R.; SILVA, N.S., BARROS, C.G.G.; SILVA, M.C.A. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabra da região de Salvador, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, 80:19-26, 2013.

CATÃO, R.M.R; ANTUNES, R.M.P; ARRUDA, T.A.; PEREIRA, M.S.V; HIGINO, J.S; ALVES, J.A; PASSOS, M.G.V.M; SANTOS, V.L. Atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 38:111-114, 2006.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS)**. Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15, 2006.

CLSI. **Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories**. CLSI/NCCLS document M100-S21, 2011.

CHAGAS, L.G.S.; MELO, P.C.; BARBOSA, N.G.; GUIMARÃES, E.C., BRITO, D.V.D. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis–Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, 28: 1007-1014, 2012.

COLOMBO, R.B.; SILVA, A.V.; MARTINS, L.A.; MELLO, P.L.; AGOSTINIS, R.O.; BARZON, E.M. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do Paraná. **Veterinária e Zootecnia**, 19:513-521, 2012.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 1:3-9, 1998.

DI MAMBRO, V.M.; FONSECA, M.J.V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37:287–295, 2005.

DOMINGUES, B.S.L.; GALDINO, M.C.; FRANCISCO, P. A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar. **Veterinária e Zootecnia**, 19:490-501, 2012.

DUMAN, A.D.; OZGEN, M.; DAYISOYLU, K.S.; ERBIL, N.; DURGAC, C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. **Molecules**, 14:1808-1817, 2009.

ENDO, E.H.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in microbiology**, 161:534-540, 2010.

FERREIRA, J.F.; OLIVEIRA, P.M.C.; CARDOSO, R.R. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso da casca da *Punica granatum* L.(romã) sobre *Streptococcus pyogenes*. **Encontro Norte-Mineiros De Biólogos – Avanços E Perspectivas**, v. 5, n. Belo Horizonte: Faculdades Unidas do Norte de Minas - UNIMONTES, p. 1-3, 2008.

FEßLER, A.T.; KASPAR, H.; LINDEMAN, C.J.; STEGEMANN, M.R.; PETERS, T.; MANKERTZ, J.; WATTS, J.L.; SCHWARZ, S. A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, 157:226-231, 2012.

FIGUEIREDO, A.P.G.D.; ARAÚJO, M.M.P.; CUNHA, A.F.D.; ALVES, J.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Qualidade do leite de propriedades da área de proteção ambiental da bacia do córrego da velha no município de Luz (Mg). **Ciência Equatorial**, 2:2, 2012.

FONTANA, V.D.S.; GIANNINI, M.J.S.M.; LETFE, C.Q.F.; MIRANDA, E.T.; ALMEIDA, A.M.F.; FONTANA, C.A.P.; SOUZA, C.M.; STELLA, A.E. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene β -lactamasis in *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, 17:552-559, 2010.

GALDINO, M.C.; DOMINGUES, P.F.; LAPENNA, B.S.L. A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar. **Veterinária e Zootecnia**, 9:490-501, 2012.

GEORGE, S.; HARRIET, J. Anti-bacterial and anti-fungal activity of botanical extracts against microorganisms isolated from mouth flora. **Biosciences International**, 1:74-77, 2012.

GOPINATH, S.M.; SUNEETHA, T.B.; MRUGANKA, V.D. Chemical prophylaxis and antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of some medicinal plants against bovine mastitis. **International Journal of Advanced Biological Research**, 1:93-95, 2011.

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

HAFTU, R.; TADDELE, H. GUGSA, G.; KALAYOU, S. Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia. **Tropica Animal Health and Production**, 44:1765-1771, 2012.

HARMON, R.; LANGLOIS, B. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practice**, 10, 1989.

HAYOUNI, E.A.; MILED, K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; IWASKI, H.; OKUE, H.; MATSUIE, T.; LIMAMA, F.; HAMDI, M. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**, 18:976-984, 2011.

HOLANDA JUNIOR, E.V.; MADALENA, F.; HOLANDA, E.; MIRANDA, W.; SOUZA, M. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos Latinoamericanos de Produção Animal**, 13:63-69, 2005.

HOLZ, D.T.; VOGEL-ELY, C.; MÜLLER, N.T.G.; FASOLO, D. Conhecimento empírico versus conhecimento científico e análise fitoquímica de espécies medicinais cultivadas por uma associação de Santo Ângelo, Rio Grande do Sul. **Revista Biociências**, 19: 12 - 23, 2013.

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, 143:397-405, 2012.

JAIN, P.; NAFIS, G. Antifungal activity and phytochemical analysis of aqueous extracts of *Ricinus communis* and *Punica granatum*. **Journal of Pharmacy Research**, 129: 128-129, 2011.

KARAASLAN, M.; VARDIN, H.; VARLIKLIÖZ, S.; YILMAZ, F.M. Antiproliferative and antioxidant activities of Turkish pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions. **International Journal of Food Science & Technology**, 49:82-90, 2014.

KOPPARAPU, N.K.; LIU, Z.; YAN, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, S. A novel thermostable chitinase (PJC) from pomegranate (*Punica granatum*) juice. **Food Chemistry**, 127:1569-1575, 2011.

KREWER, C.C.; LACERDA, I.P.D.S.; AMANSO, E.S.; CAVALCANTE, N.B.; PEIXOTO, R.D.M.; PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33:601-606, 2013.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33:620-626, 2013.

LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, 109:177- 200, 2007.

LARROSA, M.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; YÁÑEZ-GASCÓN, M.J.; SELMA, M.V.; AZORÍN-ORTUÑO, M.; TOTI, S.; ESPÍN, J.C. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 21:717-725, 2010.

LAZZARI, A.M. **Mastite induzida por *Staphylococcus aureus* em bubalinos e bovinos leiteiros**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013. 138p. Tese (Doutorado em Ciências Animais).

LEE, C.J.; CHEN, L.G.; LIANG, W.L.; WANG, C.C. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, 118:315-322, 2010.

LIMA, W.Q.F.; PEREIRA, T.C.D.; PEREIRA, M.G., BRITO, N.J.N.D., ZAMPIERON, R.G.; SILVA, G.A.D. Avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas medicinais do norte do Mato Grosso. **FACIDER-Revista Científica**, 2:2, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 350-576p.

MACHADO, T.B.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.F.R.; LEAL, I.C.R.; SILVA, M.G.; AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M.; NETTO-DOS-SANTOS, K.R. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 21:279-284, 2003.

MANASATHIEN, J.; INDRAPICHATE, K.; INTARAPICHETET, K. Antioxidant activity and bioefficacy of pomegranate *Punica granatum* Linn. peel and seed extracts. **Global Journal of Pharmacology**, 2:131-141, 2012.

MANIAN, R.; ANUSUYA, N.; SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry**, 107:1000-1007, 2008.

MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.; MENDONÇA, E.C. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33:161-170, 2013.

MELO, M.S.F.; ROCHA, C.Q.; SANTOS, M.H.; CHAVASCO, J.M.; CHAVASCO, J.K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 10:43-51, 2012.

MELLO-PEIXOTO, E.C.T.; PELANDA, A.G; RADIS, A.C; HEINZEN, E.L.; ARCIA, R.G.; VALÉRIO, A.P. Incidência de mastite bovina em animais homeopatizados. **Instituto Laticínio Cândido Tostes**, 64:66-71, 2009.

MELLO-PEIXOTO, E.C.T.; JARDIM, J.G.; HEINZEN, E.L.; DOMINGUES, P.F.; PADOVANI, C.R.; ORSI, R.O. Própolis no controle da mastite bovina. **Archives of Veterinary Science**, 17: 43-52, 2012.

MENEZES, S.M.S.; PINTO, D.M.; CORDEIRO, L.N. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L.(romã). **Revista Brasileira de Medicina**, 65:388-391, 2008.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15:316-320, 2005.

MOLINA, L.R.; GENTILINI, M.B.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; MOREIRA, G.H.F.A.; MOREIRA, L.P.V.; GONÇALVES, R.L. Utilização da vacina *Escherichia coli* J5 na imunização de vacas leiteiras contra mastites causadas por *E. coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33:291-298, 2013.

MOORTHY, K.; PUNITHA, T.; VINODHINI, R.; THIPPAN, B.; SURESHKUMAR, P.V.; THAJUDDIN, N. Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn.(pericarp). **Journal of Medicinal Plants Research**, 7:474-479, 2013.

MOOZ, E.; SILVA, M.V. Cenário mundial e nacional da produção de alimentos orgânicos. **Nutrire**, 39:99-112, 2014.

MORAIS, S.M.; LIMA, K.S.B.; SIQUEIRA, S.M.C.; CAVALCANTI, E.S.B.; SOUZA, M.S.T.; MENEZES, J.E.S.A.; TREVISAN, M.T.S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 15:575-582, 2013.

MOREIRA, G.M.B.; Matsumoto, L.S.; Silva, R.M.G; Domingues, P.F.; Mello-Peixoto, E.C.T. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34:626-632, 2014.

NADER, T.T. **Potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do Cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

NICKERSON, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* infections. **Veterinary Medicine**, 88:368-374, 1993.

NODA, Y.; KANEYUKI, T.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding, and pelargonidin. **Journal of Agricultural and Foods Chemistry**, 50:166-171, 2002.

OLIVEIRA, L.P.; PINHEIRO, R.C.; VIEIRA, M.S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; VALADARES, M.C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20:201-207, 2010.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUZA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S.; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.; BARBOSA, J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31:104-110, 2011.

ONDIEK, J.O.; OGOORE, P.B.; SHAKALA, E.K.; KABURU, G.M. Prevalence of bovine mastitis, its therapeutics and control in Tatton Agriculture Park, Egerton University, Njoro District of Kenya. **Basic Research Journal of Agricultural and Science and Review**, 2:15-20, 2013.

ORNELAS, E.A.; CERQUEIRA, M.M.; SILVA, M.C.C.; DIAS, R.S. Perfil enterotoxigênico de amostras de queijo minas artesanal produzidas na Serra da Canastra-MG. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, 2:4, 2013.

OTA. **Organic trade Association**. Disponível em: <http://www.ota.com>. Acesso em: 15, junho, 2014.

PARK, H.M.; MOON, E.; KIM, A.J.; KIM, M.H.; LEE, S.; LEE, J. B.; KIM, S.Y. Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. **International Journal of Dermatology**, 49:276-282, 2010.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, 70:391-395, 2003.

PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V.; SAMPAIO, F.C.; SAMPAIO, M.C.C.; ALVES, P.M.; ARAÚJO, C.R.F.; HIGINO, J.S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre micro-organismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16:88-93, 2006.

PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; AZEVEDO, T.K.B.; BEZERRA, D.A.C.; LIMA E.Q.; PEREIRA, M.S. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Revista de Biologia e Farmácia**, 3:1-5, 2009.

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

RABÊLO, S.V.; COSTA, M.M.; LIBÓRIO, R.C.; ALMEIDA, J.R.G.S. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36:265-271, 2014.

RAJAN, S.; RAVI, J.; SURESH, A.; GURU, S. Hidden secrets of *Punica granatum* use and its effects on oral health: a short review. **Journal of Orofacial Research**, 3:38-41, 2013.

RAZA, A.; MUHAMMAD, G.; SHARIF, S.; ATTA, A. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: a review. **Molecular Microbiology Research**, 3:1-8, 2013.

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

RIBEIRO JUNIOR, E.; SILVA, M.H.; VIEGAS, S.A.A.; RAMALHO, E.J.; RIBEIRO, M.D.; OLIVEIRA, F.C.S. *California Mastitis Test* (CMT) e whiteside como métodos de

diagnóstico indireto da mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 9:680-686, 2008.

RIBEIRO-JUNIOR, J.C.; BELOTI, V. Mastite bovina e seu reflexo na qualidade do leite – revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, 2:1-12, 2012.

RUEGG, P.L. Practical food safety interventions for dairy production. **Journal Dairy Science**, 86(Suppl.): E1-E9, 2003.

RUMMUN, N.; SOMANAH, J.; RAMSAHA, S.; BAHORUN, T.; NEERGHEEN-BHUUJUN, V.S. Bioactivity of nonedible parts of *Punica granatum* L.: a potential source of functional ingredients. **International Journal of Food Science**, 2013:1-12, 2013.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D.; PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **Journal of Clinical Microbiology**, 42:3449-3455, 2004.

SAEKI, E.K.; MELLO-PEIXOTO, E.C.T.; MATSUMOTO, L.S.; MARCUSSO, P.F.; MONTEIRO, R.M. Mastite bovina Por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, 5:284-290, 2011.

SANTOS, L.L.; PEDROSO, T.F.F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, 11:860-866, 2010.

SARAIVA, R.M.C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. Belém: Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 2012. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

SCHVARZ, D.W.; SANTOS, J.M.G.D. Mastite bovina em rebanhos leiteiros: ocorrência e métodos de controle e prevenção. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, 5:453-473, 2012.

SCHLEIFER, K.H.; KLOOS, W. E. A simple test system for the separation of *Staphylococci* from *Micrococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, 1:337-338, 1975.

SERIDAN, B.; SOUZA, M.R.; NICOLI, J.R.; CARMO, L.S.; MENEZES, L.D.M.; OLIVEIRA, D.L.S.; ANDRADE, E.H.P. *Staphylococcus aureus* FRI S-6 viability and its SEB production in cheese produced with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 64:465-470, 2012.

SILVA, M.A.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18:209-212, 2008.

SILVA, E.R.D.; PEREIRA, A.M.G.; MORAES, W.D.S.; SANTORO, K.R.; SILVA, T.R.M. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, 2012a.

SILVA, E.R.D.; SILVA, T.R.M.; PEREIRA, A.M.G.; MACHADO, A.C.; SANTORO, K.R. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina subclínica. **Acta Veterinaria Brasilica**, 6:118-123, 2012b.

SILVA, B.T.; ANJOS, C.; NOVO, S.M.F.; MATSUMOTO, L.S.; MELLO-PEIXOTO, E.C.T.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. **Bioscience Journal**, 29: 974-984, 2013.

SOUZA, M.; PEREIRA, R.; FONSECA, M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14:242-245, 2012.

SOUZA, C.M.P.; BRANDÃO, D.O.; SILVA, M.S.P.; PALMEIRA, A.C.; SIMÕES, M.O.S.; MEDEIROS, A.C.D. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande-Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15:188-193, 2013.

SPEROTTO, V.D.R.; MURARI, A.L.; SILVA, D.A.R.; POSSENTI, C.G.R.; WIEST, J.M.; AVANCINI, C.A.M. Activity of the decoction of *Achyrocline satureioides* DC (Lam.)-Asteraceae ("macela") against standard and isolated bacteria from bovine mastitis. **Acta Scientiae Veterinariae**, 40:1052, 2012.

TOKLU, H.Z.; SEHIRLI, O.; SENER, G.; DUMLU, M.U.; ERCAN, F.; GEDIK, N.; GÖKMEN, V. Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 59:1287-1295, 2007.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R.D.; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 6:10, 2008.

TREVISAN, L.F.A.; PEREIRA, A.V.; ALBUQUERQUE, A.C.L.; PEREIRA, M.S.V.; PEREIRA, J.V.; RODRIGUES, O.G.; LIMA, E.Q.; MELO, M.A. Resistência microbiana aos fármacos no tratamento de mastites: alternativas naturais para romper essa barreira. **Revista Agropecuária Técnica**, 30:51-56, 2009.

VALENTE, M.J.C. **A motivação dos pacientes no uso dos florais de bach como prática complementar em tratamentos de saúde**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. 34p. Dissertação (Mestrado em Administração).

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

WERKMAN, C.; GRANATO, D. KERBAUY, W.D.; SAMPAIO, F.C.; BRANDÃO, A.A.H.; RODE, S.M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 10:104–111, 2008.

WHO, Organização Mundial da Saúde. **Estratégia de Medicina Tradicional 2002-2005**. 2002. Acesso em: 15 de outubro de 2013.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 64:555-559, 1999.

ZUCCHI, M.R.; OLIVEIRA JÚNIOR, V.F.; GUSSONI, M.A.; SILVA, M.B.; SILVA, F.C.; MARQUES, N.E. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri-GO. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 15:273-279, 2013.