

## Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino<sup>1</sup>

Giovanna M.B. Moreira<sup>2</sup>, Leopoldo S. Matsumoto<sup>3</sup>, Regildo M.G. Silva<sup>4</sup>, Paulo F. Domingues<sup>5</sup> e Erika C.T. Mello-Peixoto<sup>6\*</sup>

**ABSTRACT.-** Moreira G.M.B., Matsumoto L.S., Silva R.M.G., Domingues P.F. & Mello-Peixoto E.C.T. 2014. [Antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of *Punica granatum* Linn. on *Staphylococcus* spp. isolated from bovine milk.] Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(7):626-632. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, BR-369 Km 54, Vila Maria, Cx. Postal 26, Bandeirantes, PR 86360-000, Brazil. E-mail: [emellopeixoto@uenp.edu.br](mailto:emellopeixoto@uenp.edu.br)

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  $10^6 \text{ml}^{-1}$ . 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 15mm 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  $4 \text{mg.mL}^{-1}$  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 ( $\text{IC}_{50} \% = 378.80 \mu\text{g/mL}$ ). 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.

INDEX TERMS: Mastitis, antimicrobial, natural extract, medicinal plants, organic production, Pomegranate.

<sup>1</sup> Recebido em 28 de fevereiro de 2014.

Aceito para publicação em 12 de maio de 2014.

<sup>2</sup> Mestranda em Agronomia, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, BR-369 Km 54, Vila Maria, Cx. Postal 26, Bandeirantes, PR 86360-000, Brasil.

<sup>3</sup> Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, BR-369 Km 54, Vila Maria, Cx. Postal 26, Bandeirantes, PR 86360-000.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras

de Assis, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Av. Dom Antônio 2100, Vila Universitária, Assis, SP 19806-900, Brasil.

<sup>5</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

<sup>6</sup> Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, BR-369 Km 54, Vila Maria, Cx. Postal 26, Bandeirantes, PR 86360-000. \*Autor para correspondência: [emellopeixoto@uenp.edu.br](mailto:emellopeixoto@uenp.edu.br)

**RESUMO.** 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 ressuscitadas a escala 6 de MacFarland e ajustada a sua concentração por espectrofotometria UV visível na concentração de 10 mL<sup>-1</sup>. Os extratos foram avaliados em quintuplicata, em sete concentrações: de 4mg mL<sup>-1</sup> até 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>. 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 1000µg.mL<sup>-1</sup>, e avaliado em triplicata. O crescimento bacteriano foi inibido a partir da concentração de 4mg.mL<sup>-1</sup> e a ação antioxidante foi verificada a partir de 50µg.mL<sup>-1</sup>, com valores correspondentes a 4.62%, atingindo platô de 64,90% na concentração de 500µg.mL<sup>-1</sup>. Na avaliação da atividade captadora de radicais, empregando o radical livre DPPH, o extrato demonstrou atividade antioxidante (IC<sub>50</sub> %= 378,80µg/mL). 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.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Mastite, antimicrobiano, extrato natural, plantas medicinais, produção orgânica, romã.

## 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, Mello-Peixoto et al. 2012, Saeki 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).

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 & 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 romanzeira, espécie da família Punicaceae, é cultivada mundialmente (Rummun et al. 2013). Foram demonstradas propriedades antimicrobianas do extrato de *Punica granatum* Lin. (Jain & 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 & 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.

## 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 exsiccata 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 30g do material vegetal em 190mL de álcool P.A. e 80mL 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 hidroalcoólica 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 2-5mm. 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 & Langlois 1989). As colônias identificadas como coagulase negativa foram submetidas a testes de resistência à novobiocina e teste de urease (Schleifer & 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<sup>-1</sup>).

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 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> por espectrofotometria de luz, em comprimento de onda de 600 nm com absorvância 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 ressuspensado em água destilada estéril na concentração inicial de 4 mg mL<sup>-1</sup>, e a partir desta solução foram realizadas as seguintes diluições: 2mg mL<sup>-1</sup>, 1mg mL<sup>-1</sup>, 0,5mg mL<sup>-1</sup>, 0,25mg mL<sup>-1</sup>, 0,125mg mL<sup>-1</sup>, 0,0625mg mL<sup>-1</sup>. Subseqüentemente uma alíquota 40µL de cada extrato foi impregnada em discos de papel filtro (*Whatman* n° 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 & 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 (25µg), penicilina (10µg), oxacilina (1µg) e tetraciclina (30µg) (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 1000µg para cada 1mL, e avaliados em triplicata.

A atividade antioxidante (AA%) do extrato foi determinada pela capacidade doadora de H<sup>+</sup> 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 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 517nm. (Brand-Williamset al. 1995). O cálculo da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a fórmula: Atividade antioxidante (%) = [(Acontrole - Aamostra) / Acontrole] x 100 onde Aamostra é a absorvância das amostras após 30 minutos e Acontrole é a absorvância 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<sub>50</sub>, 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 & 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 0,5mL de extrato, foram adicionados 5mL de água destilada e 0,25mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 minutos, foi adicionado 1mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturada a 10%, e a mistura armazenada por 1 hora. A absorvância foi medida a 725nm 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<sub>3</sub>, ocorrendo deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. Uma alíquota de 250 µL dos extratos foi adicionada a 1,25mL de água destilada e 75µL de solução de NaNO<sub>2</sub> a 5%. Após 6 minutos, 150µL de solução de AlCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O a 10% foi adicionada. Após 5 minutos, 0,5mL de solução de NaOH 1M foi adicionada, e então o volume total completado com 2,5mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vórtex e a absorvância mensurada a 510nm. 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.



## RESULTADOS

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 0,125mg mL<sup>-1</sup> (Quadro 1); ao contrário o grupo controle negativo que não apresentou ação inibitória, tão pouco interferência no crescimento microbiano.

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).

O extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. apresentou atividade antioxidante a partir da concentração de 50µg.mL<sup>-1</sup>, com valores correspondentes a 4,62%, atingindo 64,90% na concentração de 500µg.mL<sup>-1</sup>. O extrato apresentou alta atividade antioxidante com IC<sub>50</sub>% correspondendo a 378,80µg/mL. As outras concentrações utilizadas

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

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

**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**

Antibió-ticos <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>S. aureus</i>	<i>S. coagulase</i> 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 <sup>b</sup>	33.0	25	26	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> AMP 10 = Ampicilina 10µg, SUT = Sulfametoxazol + Trimetropim 23,75µg/1,25µg, OXA = Oxacilina 1µg, PEN 10 = Penicilina 10 un.), TET 30 = Tetraciclina 30µg) (CLSI, 2011); <sup>b</sup> Resistente.

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

Concentração µg.mL <sup>-1</sup>	(AA%)
25	0
50	4,62
75	4,42
100	32,99
250	35,59
500	64,90
1000	78,35

nesta análise também apresentaram atividade (Quadro 3), entretanto, a atividade antioxidante não foi correlacionada aos teores de fenóis totais e flavonoides.

## 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, Mello-Peixoto et al. 2012, Saeki 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. (2012), 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 antisepsia oral corresponde à clorexidina, esses pesquisadores re-

alizaram 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 36mm 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 15mm diâmetro. Pereira et al. (2006); Saeki et al. (2012) e Silva et al. (2013) também verificaram halos de inibição maiores que 15mm. 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 1250µg/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±1.31mm, 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. 2012, Silva et al. 2013). Gopinath et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos de *Cymbopogon citratus*, *Punica granatum* L, *Pennisetum setaceum* e *Nerium oleander*. Esses autores concluíram que os extratos de *Citratos cymbopogon* e *Punica granatum* L apresentaram atividade antibacteriana, sendo que a maior potência foi observada para o extrato de *Punica granatum* L. verificando halos de inibição de 36, 25, 27 e 32mm 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, Mello-Peixoto et al. 2012, Saeki 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 & 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 as 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 a partir da romã, pode representar alternativa importante 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.

## 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.

**Agradecimentos.**- 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.

## REFERÊNCIAS

- Almeida L.F.D., Cavalcanti Y.W., Lira Júnior R., Oliveira L.E. & Casto R.D. 2012. Efeito antifúngico de tinturas de propólis e romã sobre espécies de *Candida*. *Revta Cub. Estomat.* 49:99-106.
- Al-Zahrani S.H.M. 2012. Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Sci.* 8:2.
- Arif T., Mandal T.K. & Dabur R. 2011. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Prod. Med. Chemistry* 81:283-311.
- Baker J.S., Hackett M.F. & Simard D.J. 1986. Variations in bacitracin susceptibility observed in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 23:963-964.
- Barbosa M.S. & Vieira G.H.C. 2011. Diagnóstico e prevenção de mastite em vacas leiteiras no município de Cassilândia/MS. *Anais 1º Semex, Dourados, MS.* p.3. (Resumo)
- Barros J.D., Souza Filho S., Castro V., Torres V.M., Higino J.S. & Melo A.F.M. 2011. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e determinação da CL50 do extrato bruto seco da *Vitex agnus castus* Linn. *Revta Eletr. Farmácia* 7:10.
- Bianchi M.L.P. & Antunes L.M.G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revta Nutr.* 12:123-130.
- Blois M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. & Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Technol.* 28:25-30.
- Brasil 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade coleta e transporte de leite. Instrução Normativa nº 051 de 18 de setembro de 2002, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- 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. 2006. Atividade antimicrobiana. *Revta Bras. Anal. Clin.* 38:111-114.
- CLSI 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15.
- CLSI 2011. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Non-fastidious Organisms by Clinical Laboratories, publication. CLSI/NCCLS document M100-S21.
- Chagas L.G.S., Melo P.C., Barbosa N.G., Guimarães E.C. & Brito D.V.D. 2012. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis-Minas Gerais, Brasil. *Biosci. J.* 28:1007-1014.
- Colombo R.B., Silva A.V., Martins L.A., Mello P.L., Agostinis R.O. & Barzon E.M. 2012. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do Paraná. *Vet. Zootec.* 19:513-521.
- Di Mambro V.M. & Fonseca M.J.V. 2005. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis* 37:287-295.
- Duman A.D., Ozgen M., Dayisoylu K.S., Erbil N. & Durgac C. 2009. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules* 14:1808-1817.
- Feßler A.T., Kaspar H., Lindeman C.J., Stegemann M.R., Peters T., Mankertz J., Watts J.L. & Schwarz S. 2012. A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 157:226-231.
- Fontana V.L.D.S., Giannini M.J.S.M., Leite C.Q.F., Miranda E.T., Almeida A.M.F., Fontana C.A.P., Souza C.M. & Stella A.E. 2010. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da  $\beta$ -lactamase em *Staphylococcus aureus*. *Vet. Zootec.* 17:552-559.
- Galdino M.C., Domingues P.F. & Lapenna B.S.L. 2012. A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar. *Vet. Zootec.* 19:490-501.
- Gopinath S.M., Suneetha T.B. & Mruganka V.D. 2011. Chemical prophylaxis and antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of some medicinal plants against bovine mastitis. *Int. J. Adv. Biol. Res.* 1:93-95.
- Haftu R., Taddele H., Gugsu G. & Kalayou S. 2012. Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:1765-1771.
- Harmon R.J. & Langlois B.E. 1989. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Agri-Practice* 10.
- Hayouni E.A., Miled K., Boubaker S., Bellasfar Z., Abedrabba M., Iwaski H., Iwaskie H., Okue H., Matsuie T., Limama F. & Hamdi M. 2011. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds. *Phytomedicine* 18:976-984.
- Ismail T., Sestili P. & Akhtar S. 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J. Ethnopharmacol.* 143:397-405.
- Jain P. & Nafis G. 2011. Antifungal activity and phytochemical analysis of aqueous extracts of *Ricinus communis* and *Punica granatum*. *J. Pharmacy Res.* 4:128-129.
- Langoni H. 2013. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 33:620-626.
- Lansky E.P. & Newman R.A. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* 109:177-206.
- Lee C.J., Chen L.G., Liang W.L. & Wanga C.C. 2010. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry* 118:315-322.
- 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. 2003. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21:279-284.
- Manasathien J., Indrapichate K. & Intarapichet K. 2012. Antioxidant activity and bioefficacy of pomegranate *Punica granatum* Linn. peel and seed extracts. *Glob. J. Pharmacology* 2:131-141.
- Manian R., Anusuya N., Siddhuraju P. & Manian S. 2008. 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.
- Marques V.F., Souza M.M.S., Mendonça E.C.L., Alencar T.A., Pribul B.R., Coelho S.M.O., Lasagno M. & Reinoso E.B. 2013. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 33:161-170.



- Mello-Peixoto E.C.T., Jardim J.G., Heinzen E.L., Domingues P.F., Padovani C.R. & Oliveira Orsi R. 2012. Própolis no controle da mastite bovina. *Archs Vet. Sci.* 17:43-52.
- Menezes S.M.S., Pinto D.M. & Cordeiro L.N. 2008. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L. (romã). *Revta Bras. Med.* 65:388-391.
- Moorthy K., Punitha T., Vinodhini R., Thippan B., Sureshkumar B.T. & Vijayalakshmi P. 2013. Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. (PERICARP). *J. Med. Plants Res.* 7:474-479.
- 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. 2013. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. *Revta Bras. Plantas Medicinai* 15:575-582.
- Nickerson S.C. 1993. Preventing new *Staphylococcus aureus* infections. *Vet. Med.* 88:368-374.
- Noda Y., Kaneyuki T., Mori A. & Packer L. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J. Agricult. Food Chem.* 50:166-171.
- Oliveira L.P., Pinheiro R.C., Vieira M.S., Paula J.R., Bara M.T.F. & Valadares M.C. 2010. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Revta Bras. Farmacogn.* 20:201-207.
- Oliveira C.M.C., Souza M.G.S., Silva N.S., Mendonça C.L., Silveira J.A.S., Oai-gen R.P., Andrade S.J.T. & Barbosa J.D. 2011. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 31:104-110.
- Ondiek J.O., Ogore P.B., Shakala E.K. & Kaburu G.M. 2013. Prevalence of bovine mastitis, its therapeutics and control in Tatton Agriculture Park, Egerton University, Njoro District of Kenya. *Basic Res. J. Agricult. Sci. Rev.* 2:15-20.
- Pedrini S.C.B. & Margatho L.F.F. 2003. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 70:391-395.
- Pereira J.V., Pereira M.S.V., Sampaio F.C., Sampaio M.C.C., Alves P.M., Araújo C.R.F. & Higino J.S. 2006. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Revta Bras. Farmacogn.* 16:88-93.
- Pereira A.V., Rodrigues O.G., Azevêdo T.K.B., Bezerra D.A.C., De Lima E.Q. & Pereira M.S.V. 2009. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. *Revta Biol. Farmácia* 3:1-5.
- Pinto M.S., Faria J.E., Message D., Cassini S.T.A., Pereira C.S. & Gioso M.M. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:278-283.
- Rajan S., Ravi J., Suresh A. & Guru S. 2013. Hidden secrets of *Punica granatum* use and its effects on oral health: a short review. *J. Orofacial Res.* 3:38-41.
- Raza A., Muhammad G., Sharif S. & Atta A. 2013. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: a review. *Molec. Microbiol. Res.* 3:1-8.
- Ribeiro M.G., Geraldo J.S., Langoni H., Lara G.H.B., Siqueira A.K., Salerno T. & Fernandes M.C. 2009. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesq. Vet. Bras.* 29:52-58.
- Rummun N., Somanah J., Ramsaha S., Bahorun T. & Neergheen-Bhujun V.S. 2013. Bioactivity of nonedible parts of *Punica granatum* L.: a potential source of functional ingredients. *Int. J. Food Sci.* 2013:1-12.
- Ruegg P.L. 2003. Practical food safety interventions for dairy production. *J. Dairy Sci.* 86(Suppl.):E1-E9.
- Sabour P.M., Gill J.J., Lepp D., Pacan J.C., Ahmed R., Dingwell R. & Leslie K. 2004. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *J. Clin. Microbiol.* 42 :3449-3455.
- Saeki E.K., Mello-Peixoto E.C.T., Matsumoto L.S., Marcusso P.F. & Monteiro R.M. 2012. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. *Acta Vet. Bras.* 5:284-290.
- Santos L.L., Pedroso T.F.F. & Guirro E. 2010. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. *Ciênc. Anim. Bras.* 11:860-866.
- Saraiva R.M.C. 2012. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente a bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 67p.
- Schleifer K.H. & Kloos W.E. 1975. A simple test system for the separation of *staphylococci* from micrococci. *J. Clin. Microbiol.* 1:337-338.
- Silva M.A.R., Higino J.S., Pereira J.V., Siqueira-Júnior J.P. & Pereira M.S.V. 2008. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. *Revta Bras. Farmacogn.* 18:209-212.
- Silva B.T., Anjos C., Novo S.M.F., Matsumoto L.S., Mello-Peixoto E.C.T., Silva L.P. & Silva R.M.G. 2013. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. *Biosci. J.* 29:974-984.
- Souza C.M.P., Brandão D.O., Silva M.S.P., Palmeira A.C., Simões M.O.S. & Medeiros A.C.D. 2013. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande-Paraíba. *Revta Bras. Plantas Medicinai* 15:188-193.
- Tozzetti D.S., Bataier M.B.N., Almeida L.R. & Piccinin A. 2008. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. *Revta Cient. Eletr. Med. Vet.* 6:10.
- 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. 2009. Resistência microbiana aos fármacos no tratamento de mastites: alternativas naturais para romper essa barreira. *Revta Agropec. Téc.* 30:51-56.
- Werkman C. & Granato D. 2008. Aplicações terapêuticas de *Punica granatum* L. (romã). *Revta Bras. Plantas Medicinai* 10:104-111.
- Zhishen J., Mengcheng T. & Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64:555-559.