

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATO DE *Punica granatum* L. SOBRE *Staphylococcus aureus* ISOLADO EM LEITE BOVINO**

*ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN VITRO OF EXTRACTS OF Punica granatum L. OVER Staphylococcus aureus ISOLATED IN BOVINE MILK*

**Bruno Toledo SILVA<sup>1</sup>; Carolina dos ANJOS<sup>1</sup>; Sylvia Marquart Fontes NOVO<sup>1</sup>;  
Leopoldo Sussumu MATSUMOTO<sup>2</sup>; Erika Cosendey Toledo de Mello PEIXOTO<sup>2</sup>;  
Luciana Pereira SILVA<sup>3</sup>; Regildo Márcio Gonçalves da SILVA<sup>3</sup>**

1. Acadêmico em Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP, Bandeirantes, Paraná, Brazil. 2. Professor(a), Doutor(a), UENP, Bandeirantes, Paraná, Brasil. 3. Professor(a), Doutor(a), Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Fitoterápicos - FITOLAB, Assis, SP, Brasil. [luciana@assis.unesp.br](mailto:luciana@assis.unesp.br)

**Resumo:** Mastite bovina é considerada principal doença causadora de grandes perdas econômicas nos rebanhos leiteiros. Antimicrobianos químicos promovem resistência farmacológica, resíduos no alimento e contaminação ambiental. Este estudo objetivou verificar a atividade antibacteriana, *in vitro*, do extrato de romã em *Staphylococcus aureus* isolado de leite bovino, avaliar sua atividade antioxidante, e quantificar teores de fenóis e flavonoides totais nos diferentes extratos utilizados. Utilizou-se para tanto extratos aquosos da casca do fruto (EAC) e folhas (EAF), secos e *in natura* de romã. Adicionalmente, avaliou-se atividade antioxidante (AA%), teores de fenóis e flavonoides totais. Amostras de leite foram semeadas, incubadas, e as colônias de *Staphylococcus aureus* foram ajustadas a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL ao padrão nº6 da escala de MacFarland. A sensibilidade dos isolados microbianos foi determinada, em quintuplicata, pela técnica de difusão em discos. A Concentração Inibitória Mínima foi determinada pelo halo de inibição superior a 15 mm. Os resultados foram avaliados pelo método ANOVA, teste de Tukey 5%, utilizando-se o programa SISVAR 5.3 - DEX/UFLA. EACseco inibiu crescimento bacteriano a partir de 3%. EAFseco, EAC*in natura* e EAF*in natura*, só apresentaram esta atividade a partir de 15%, 20% e 30% respectivamente. A ação antioxidante do EACseco foi verificada a partir de 75µg/mL, com valores correspondentes a 14,2%, atingindo um platô de 65,9% na concentração de 250µg/mL. Entretanto, essa atividade não foi correlacionada aos teores de fenóis totais e flavonoides. Provavelmente outras substâncias alcalóides, podem ter sido responsáveis por esta atividade. Conclui-se que os extratos de *Punica granatum* L., principalmente aquele obtido pela casca do fruto seco, demonstraram atividade inibitória sobre *S. aureus*, evidenciando a potencialidade de seu uso para o controle da mastite bovina.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agroecologia. Antibacteriano. Mastite. Produção Animal Orgânica. Produção Biodinâmica

## INTRODUÇÃO

Mastite bovina caracteriza-se frequentemente por inflamação da glândula mamária em resposta à infecção bacteriana, podendo ser causada por outros microrganismos como micoplasma, fungos ou algas (TOZZETI et al., 2008). Determina diminuição da produção e compromete a qualidade do leite pelo risco de veiculação de agentes patogênicos, diminuição de caseína, gordura e lactose, além de prejudicar o rendimento industrial e o tempo de conservação do produto no comércio (BRIETZKE, 2004).

Ocorre sob as formas clínica ou subclínica; esta última apresenta maior importância, pois normalmente o processo é crônico e permanece quiescente no rebanho sem determinar sinais clínicos ou qualquer alteração macroscópica no úbere ou leite. Além disso, apresenta prevalência de 15 a 40 vezes maior que a forma clínica, e usualmente precede a mesma (FONTANA et al., 2010).

A forma subclínica é transmitida durante a ordenha por microorganismos patogênicos adaptados à glândula mamária, principalmente pelas bactérias do gênero *Streptococcus* como *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* e também por espécie do gênero *Staphylococcus* como *S. aureus* (FERREIRA et al., 2007; MELLO-PEIXOTO et al., 2009; SAEKI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

É considerada como principal doença dos rebanhos leiteiros, devido aos prejuízos econômicos para o produtor e laticínios. Reduz rendimento de derivados, determina gastos com medicamentos, mão-de-obra, serviços veterinários e compromete a qualidade do leite. Quartos mamários portadores de mastite subclínica diminuem a produção em média entre 25 a 42%. Entretanto, foram registrados valores entre 20 e 71% nos estados de Minas Gerais e São Paulo respectivamente (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008).

O tratamento usual da mastite subclínica se faz utilizando antimicrobianos químicos, porém durante a lactação este tratamento é pouco frequente

pela baixa eficácia na dependência da etiologia infecciosa da doença e presença de resíduos, quando não obedecido o manejo correto após o tratamento, necessitando assim o descarte do leite (BRASIL, 2002; RIBEIRO et al., 2003). Dessa forma, o produtor busca soluções que tratem do problema sem gerar descarte do produto (ALMEIDA et al., 2011).

A necessidade de tratamento da mastite tem sido considerada, pois quanto mais precocemente for tratada, maiores chances de recuperação e menores chances de proliferação da doença entre os animais. Faz-se necessário monitoramento dos animais, do homem, ambiente, instalações, manejo de ordenha, entre outros fatores. Assim, a mastite é considerada enfermidade multifatorial de difícil controle e erradicação. Portanto, seu controle deve ser estabelecido inclusive para forma subclínica, uma vez que o fator que mais contribui para seu alto índice é a duração das infecções (BRITO; BRITO, 2000).

Resíduos medicamentosos afetam a saúde humana e interferem nos processos de fermentação na indústria leiteira. Alto custo, resistência bacteriana e presença de resíduos no ambiente e alimento, são fatores cada vez mais limitantes ao uso de antimicrobianos químicos. Mudanças nos conceitos de produção exigem que o alimento seja produzido em condições higiênicas, por animais sadios e que não estejam eliminando resíduos de antibióticos ou de outras drogas.

Neste cenário, destaca-se o estudo de plantas medicinais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem valorizado a utilização de plantas medicinais, em função de que 80% da população mundial depende dessa terapêutica de baixo custo (WHO, 2002). No Brasil foram estabelecidas diretrizes para o uso de plantas medicinais na saúde pública, com a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006).

A árvore Romãzeira (*Punica granatum* L.), encontrada em todo Brasil, pertence à família Punicaceae, é conhecida principalmente por suas propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (FERREIRA et al., 2008). É popularmente utilizada contra faringites, amigdalites entre outras afecções (BRASILEIRO et al., 2008; SILVA et al., 2008). Pereira et al. (2006), Silva et al. (2008), Schreiner et al. (2009), Menezes et al. (2008) e Voss-Rech et al. (2011), relataram sua eficácia antibacteriana frente a diferentes microrganismos, dentre eles, *Staphylococcus aureus*.

Propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias apresentadas pelos extratos de romã

são particularmente importantes para o tratamento da mastite bovina. Da mesma forma, ação antioxidante é relevante pela possibilidade terapêutica quanto ao sequestro de radicais livres. Radicais livres e outros oxidantes são responsáveis por diversas alterações degenerativas celulares. Arteriosclerose, cardiopatias e derrames são alguns problemas relacionados às oxidações dos ácidos graxos poli-insaturados e que aparecem com menor risco naqueles que ingerem maiores quantidades de flavonoides. Flavonóides apresentam conformação estrutural ideal para sequestro de radicais livres, sendo encontrados em todos os órgãos vegetais, principalmente nos frutos.

Os principais constituintes da romã são alcaloides (peletierina, isopeletierina, metilpeletierina), taninos, compostos fenólicos (antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos) e flavonoides (LANSKY e NEWMANN, 2007), substâncias frequentemente relatadas como as principais responsáveis pelas atividades terapêuticas. Dessa forma, objetivou-se verificar a atividade antibacteriana, *in vitro*, do extrato de romã em *Staphylococcus aureus* isolado de leite bovino, avaliar sua atividade antioxidante, e quantificar teores de fenóis e flavonoides totais nos diferentes extratos utilizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico (folhas e cascas do fruto) de *Punica granatum* (L.), foi colhido no mês de setembro de 2011, na área urbana do município de Bandeirantes - Paraná (posição geográfica 23° 07,02' 62"S e 50° 22,06' 75'O). 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.

A coleta do material vegetal foi realizada em único dia, ao final da manhã, com temperatura de 25°C e umidade relativa do ar de 80%, logo após o material foi levado ao laboratório de Óleos essenciais & Bioterápicos da Universidade Estadual do Norte do Paraná, onde realizou-se lavagem, secagem com papel toalha e acondicionamento em saco de papel *craft*. Para obtenção do peso seco, foi realizada secagem em estufa com circulação forçada de ar à 60°C, até atingir peso constante, o que ocorreu após 72 horas.

Procedeu-se maceração manual em cadinho de cerâmica. Para confecção do extrato aquoso a utilizou-se 50g do material macerado em 200 mL de água destilada autoclavada necessárias à submersão, conforme realizado por Ferreira et al. (2008). Para o extrato *in natura*, o material não sofreu secagem em

estufa, dessa forma, 100 mL de água destilada autoclavada foram suficientes para total submersão do material vegetal (50g).

Após, realizou-se cocção em banho-maria à 70°C por 60 minutos (CARPES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010), e filtragem através de algodão hidrófilo (FERREIRA et al., 2008). Subsequentemente, o material foi acondicionado em frasco de vidro âmbar, estéril, e congelado em freezer à -20°C (JARDINI, 2010).

Para a obtenção das amostras de leite foram analisadas 14 fêmeas bovinas da raça Jersey provenientes de rebanho comercial. Foram realizados em único dia, teste de Tamis e Califórnia Mastite Teste (CMT) para o diagnóstico da mastite clínica e subclínica, respectivamente.

O teste de Tamis foi realizado antes da primeira ordenha do dia, a partir da coleta dos três primeiros jatos de leite de cada quarto mamário. Pesquisou-se a presença de grumos, coágulos, pus ou outras alterações sugestivas de mastite clínica. Após o teste de tamis, procedeu-se CMT, que foi realizado de acordo com Schalm e Noorlander (1957), misturando-se igual quantidade de lauril sulfato de sódio a 3% com leite colhido de cada quarto mamário. O teste foi classificado como amostras negativas (amostras não reagentes) ou positivas correspondentes a leve formação de gel (escore +), apresentação de formação mais espessa de gel com mamilo central (escore ++) e formação de gel muito espesso aderente ao fundo do recipiente (escore +++).

Subsequentemente, para as amostras positivas ao CMT, procedeu-se análise microbiológica. As amostras foram colhidas, antissépticamente após as mãos serem lavadas, desinfetadas (álcool 70%) e enluvadas. As tetas foram lavadas com água, secas com papel toalha e suas extremidades desinfetadas com algodão embebido com álcool 70%. Após coleta de única amostra para cada quarto mamário positivo, as mesmas foram acondicionadas em caixa isotérmica, transportadas sob refrigeração de aproximadamente 4°C, e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná em Bandeirantes – PR. Posteriormente, foram mantidas congeladas em freezer a -20°C, até o momento da realização dos exames microbiológicos.

A partir das amostras provenientes dos quartos mamários positivos ao CMT, foram aleatoriamente selecionadas apenas 10 amostras, para semeadura em placas de Petri contendo meio Ágar Baird Parker® enriquecido com emulsão de gema de ovo com telurito, e posteriormente

incubadas a 37°C por 48 horas (CARTER, 1988). As colônias bacterianas foram caracterizadas como *Staphylococcus aureus* de acordo com Oxoid (2000). Apresentaram coloração cinza-negra, brilhante, forma convexa, com zona de precipitação circundada por halo claro de 2-5mm. As mesmas foram submetidas à inoculação em suspensão salina estéril, e avaliadas por espectrofotometria de luz. Os inócuos foram ajustados em concentração celular entre 0,40 e 0,49 nm de absorbância, com comprimento de onda de 600nm, determinando a concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. Assim, os inócuos apresentaram turvação ajustada ao padrão nº6 da escala de MacFarland (NCCLS, 1997).

A sensibilidade dos isolados microbianos aos tratamentos foi determinada pela técnica de difusão em discos de papel filtro (Whatman nº 1) com 7mm de diâmetro, impregnados com alíquotas de 40µL de cada extrato (PEREIRA et al., 2009), e avaliadas em quintuplicata. Foram avaliadas, a partir da solução inicial, as concentrações de 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40,50% e 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25% para os extratos confeccionados a partir dos materiais vegetais *in natura* e após secagem, respectivamente. Este procedimento foi realizado em Câmara de Fluxo Unidirecional, onde os discos foram fixados, sobre meio Ágar *Mueller-Hinton*, previamente semeado com auxílio de suabe estéril pelos inóculos bacterianos obtidos. Posteriormente este material foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Foram realizados os tratamentos: Extrato Aquoso da Casca *in natura* (EAC*in natura*), seco (EACseco), Extrato Aquoso da Folha *in natura* (EAF*in natura*) e seco (EAFseco), além dos tratamentos controle negativo com discos de papel filtro estéreis, e controle positivo a base de antimicrobianos químicos: ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), ác. nalidíxico (30 µg), eritromicina (5 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacin (10 µg) e vancomicina (30 µg).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pela menor concentração do extrato que inibe completamente o crescimento bacteriano, observada pela presença do halo de inibição de crescimento bacteriano visível superior a 15 mm (PEREIRA et al., 2006). As concentrações sensíveis foram submetidas ao método ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade; utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.3 - DEX / UFPA.

O peso seco do extrato foi determinado a partir de três alíquotas de 1mL da solução, a qual foi colocada em estufa a  $45 \pm 1$  °C, em becker (P1), até a obtenção de peso constante. O valor obtido (P2)

foi referente à concentração em mg / mL<sup>-1</sup>. Foi utilizada a seguinte fórmula:  $(P2 - P1) / 2$  (BETONI et al., 2006).

Para a determinação do teor de resíduo seco, três amostras de 20g foram colocadas em cadinhos, submetidos à evaporação em banho-maria, e secagem em estufa a 105°C por 2 horas. Posteriormente as amostras foram resfriadas em dessecador por 20 minutos e pesadas. Após nova secagem em estufa por 60 minutos a 105°C, as amostras foram resfriadas e novamente pesadas. Esse procedimento foi repetido até obtenção de peso constante. A porcentagem da perda por dessecação foi obtida pela equação:  $100 - [(P2-P3 / P1) \times 100]$ , onde P1 = peso da amostra, P2 = Peso do cadinho contendo amostra antes da dessecação, e P3 = Peso do cadinho contendo amostra após dessecação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Para determinação da atividade antioxidante (AA%), teores de fenóis totais e flavonoides, os extratos foram encaminhados ao Laboratório de Fitoterápicos do Departamento de Biotecnologia, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Assis. Após liofilização, os extratos foram diluídos nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000%, e avaliados em triplicata.

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pela capacidade doadora de H<sup>+</sup> para o radical estável DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com a metodologia *in vitro* proposta por Blios (1958). Este método baseia-se na redução do radical livre estável DPPH de coloração violeta, à DPPH de coloração amarelada, 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. O teste é sensível para detectar baixas concentrações dos princípios ativos (MANIAN et al., 2008), além de baixo valor de IC<sub>50</sub>, ou seja, capacidade do extrato inibir a oxidação do radical em 50% (Di MAMBRO; FONSECA, 2005).

Foram utilizados 1mL de solução de tampão acetato (pH 5,5 e 100mM), 1,25mL de etanol P.A., 250µL de solução de DPPH<sup>•</sup> (250µM) e 50µL das amostras. O DPPH apresenta máxima absorvância à 517nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H<sup>+</sup>, indicada pela mudança da coloração roxa para amarelo. 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-WILLIAMS et al., 1995). O cálculo da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a fórmula: Atividade antioxidante (%) =

$[(A_{controle} - A_{amostra}) / A_{controle}] \times 100$  onde A<sub>amostra</sub> é a absorvância das amostras após 30 minutos e A<sub>controle</sub> é a absorvância do DPPH; ambos a 517nm.

Para determinação de fenóis totais, o método utilizado foi o de *Folin-Ciocalteu*, utilizando ácido gálico como padrão de comparação. A cada 0,5mL de extrato, foi adicionado 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 considerada 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 250µL 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, 0,5 mL de solução de NaOH 1M foi adicionada, e então o volume total completado com 2,5mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vortex e a absorvância 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.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada ocorrência de mastite subclínica em 12 animais (85%) dentre os 14 avaliados, de acordo com o CMT. Estes dados corroboram com os registros que referem à mastite bovina como sendo uma das principais doenças da bovinocultura leiteira, por se apresentar amplamente disseminada (MELLO-PEIXOTO et al., 2009; MARTINS et al., 2010). Contudo, nenhum animal avaliado e positivo para o CMT apresentou a forma clínica da doença, tal constatação também está de acordo com trabalhos realizados, pois os mesmos demonstraram que existe maior prevalência de mastite subclínica em comparação a clínica (SAEKI et al., 2011, SANTOS et al., 2011).

No que diz respeito aos microorganismos causadores da mastite bovina, o *Staphylococcus aureus* destaca-se como principal agente etiológico da forma subclínica da doença (ZAFALON et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; MELLO-PEIXOTO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; MARTINS et al. 2010; SAEKI et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Diante disso, o presente estudo avaliou especificamente o efeito do extrato de romã sobre este micro-organismo. O mesmo é considerado a espécie mais virulenta do gênero *Staphylococcus*, devido à formação de toxinas, enzimas mediadoras de invasão tecidual e sobrevivência no sítio da infecção (BLATT e PIAZZA, 2004). A dificuldade de controlar este microrganismo é devido provavelmente ao fato de estar adaptado ao tecido mamário, o que facilita as infecções (ZANETTE et al., 2010).

Outro fator que levou a escolha do *Staphylococcus aureus* neste estudo foi que trabalhos recentes demonstram que o mesmo está envolvido também como principal causador da mastite em outros mamíferos de interesse pecuário como búfalas, cabras e ovelhas (FREITAS et al., 2009; DRESCHER et al., 2010; NEVES et al., 2010). Destaca-se então, a importância de avaliações periódicas do perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana em propriedades leiteiras, pois a falta de tal procedimento pode comprometer os programas de controle da mastite bovina (MEDEIROS et al., 2009).

Os grupos referentes aos tratamentos controles positivos, realizados pelo uso de antimicrobianos químicos, apresentaram formação de halos inibitórios, ao contrário do que foi observado em relação aos grupo controle negativo,

que não apresentou ação inibitória, tão pouco interferência no crescimento bacteriano.

Dentre os antimicrobianos testados, os agentes mais eficientes foram ampicilina, norfloxacin, gentamicina, cefalexina, vancomicina e eritromicina com 100% de eficácia, sendo que o ácido nalidíxico apresentou eficácia de 50%. Esses resultados são semelhantes aos apresentados por Saeki et al. (2011), Andrade et al. (2010) e Fontana et al. (2010). Peixoto et al. (2010) verificaram alta frequência de isolados sensíveis aos antimicrobianos avaliados, sendo o menor percentual de sensibilidade para o ácido nalidíxico; assim como no presente estudo.

Em relação aos extratos aquosos da romã, o da casca do fruto seco (EACseco) apresentou os melhores resultados antibacterianos, uma vez que foi capaz de inibir o crescimento bacteriano a partir da concentração 3%. Os demais tratamentos só apresentaram esta atividade a partir das concentrações de 15%, 20% e 30% para o EAFseco, EACin natura e EAFin natura, respectivamente (Tabelas 1 e 2). Esses resultados corroboram aos registrados por Pereira et al. (2006), que verificaram sensibilidade de cinco linhagens bacterianas frente à *Punica granatum L.*

Schreiner et al. (2009), relataram que extrato de *Punica granatum L.* pode reduzir aproximadamente 78% a contaminação microbiana inespecífica. Silva et al. (2008) verificaram atividade bacteriostática da romã, testadas em 38 cepas diferentes de *Staphylococcus aureus*. De acordo com Menezes et al. (2008), a romã se mostra efetiva na inibição do crescimento de bactérias Gram positivas, especificamente *S. aureus*.

**Tabela 1.** Distribuição das médias (mm) dos halos de inibição bacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, observados para os tratamentos Extrato Aquoso da Casca seco (EACseco) e Extrato Aquoso da Folha seco (EAFseco).

Tratamentos	Halo de inibição (mm)	
	EACseco**	EAFseco***
1%	7,6 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
3%	18,0 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>
5%	20,0 <sup>b</sup>	13,2 <sup>bc</sup>
10%	23,6 <sup>b</sup>	18,4 <sup>abc</sup>
15%	24,8 <sup>ab</sup>	23,6 <sup>a</sup>
20%	28,0 <sup>ab</sup>	26,8 <sup>a</sup>
25%	30,0 <sup>a</sup>	20,8 <sup>ab</sup>
SMI*	15,0 <sup>c</sup>	15,0 <sup>c</sup>

\*Dados de SMI (Sensibilidade Mínima de Inibição); Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Análises estatísticas baseadas na \*\*DMS (diferença mínima significativa) = 2,89; \*\*\* DMS = 4,53

**Tabela 2.** Distribuição das médias (mm) dos halos de inibição bacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, observados para os tratamentos Extrato Aquoso da Casca *in natura* (EACin *natura*) e Extrato Aquoso da Folha (EAFin *natura*).

Concentrações	Halos de inibição (mm)	
	EACin <i>natura</i> **	EAFin <i>natura</i> ***
1%	4 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
3%	17,2 <sup>bc</sup>	0 <sup>d</sup>
5%	20,8 <sup>abc</sup>	0 <sup>d</sup>
10%	17,2 <sup>bc</sup>	13,2 <sup>bc</sup>
20%	21,6 <sup>ab</sup>	14,4 <sup>bc</sup>
30%	20,4 <sup>abc</sup>	18,0 <sup>ab</sup>
40%	25,2 <sup>a</sup>	17,6 <sup>ab</sup>
50%	25,6 <sup>a</sup>	19,2 <sup>a</sup>
SMI*	15,0 <sup>c</sup>	15,0 <sup>c</sup>

\*Dados: SMI (Sensibilidade Mínima de Inibição); Médias seguidas de letra iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Análises estatísticas baseadas na \*\*DMS (diferença mínima significativa) = 5,92; \*\*\* DMS = 2,13

Catão et al. (2006), evidenciaram sensibilidade de todas as 17 cepas de *S. aureus* submetidas ao extrato etanólico de romã a 10%. Registraram que a eficácia diminuía à medida que se aumentava a diluição do extrato, o que também foi verificado pelo presente estudo.

Ao estudar as aplicações terapêuticas da romã, Werkman et al. (2008) destacaram as propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias. Enfatizaram a possibilidade no emprego em infecções hospitalares, devido à resistência bacteriana aos antibióticos convencionais.

Atividade bacteriana é particularmente importante para o tratamento da mastite, da mesma forma, a ação antioxidante é relevante pela possibilidade terapêutica no sequestro de radicais livres. Entretanto, a romã apresenta composição

química extremamente complexa, com atividade terapêutica específica para cada composto. Assim, considerando que compostos fenólicos e flavonoides são os maiores responsáveis pela atividade terapêutica da romã (DUMAN et al., 2009; AL-ZAHRANI, 2012), optou-se pela mensuração dos mesmos.

Em relação ao EACseco, que apresentou melhores resultados bactericidas, verificou-se valor de peso seco de 112,6 mg/mL, e 6,25% de resíduo seco. Este extrato apresentou atividade antioxidante a partir da concentração de 75µg/mL, com valores correspondentes a 14,20%, atingindo platô de 65,89% na concentração de 250µg/mL. Os demais extratos apresentaram atividade antioxidante, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores médios referentes à atividade antioxidante (AA%) para os extratos aquosos da Casca *in natura* (EACin *natura*) e seca (EAC seco), da Folha *in natura* (EAF *in natura*) e seca (EAF seco).

Concentração (µg/mL)	AA%			
	EACin <i>natura</i>	EACseco	EAFin <i>natura</i>	EAFseco
25	-	-	5,07	8,16
50	7,93	-	15,21	23,80
75	16,66	14,20	20,28	37,41
100	57,93	15,36	71,01	45,57
250	68,25	65,89	66,66	76,87
500	78,57	69,37	76,08	77,55
1000	80,15	66,95	76,08	76,87

Entretanto, essa atividade não foi correlacionada aos teores de fenóis totais e flavonoides. Na investigação fitoquímica, para as concentrações avaliadas, não foi constatada presença significativa de compostos fenóis totais e flavonoides. Talvez outras substâncias alcalóides presente no extrato estudado, possam ter sido as responsáveis pela atividade antioxidante verificada.

Machado et al. (2003) 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 *P. granatum* e apontaram a contribuição de três antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidine) para atividade antioxidante. Salientaram que estas

antocianinas inativam o superóxido e inibem a peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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.

Assim, a utilização de produtos naturais, principalmente fitoterápicos confeccionados a partir da romã, representa ferramenta importante para o controle da sanidade animal, principalmente para sistemas de produção orgânica ou biológico-dinâmico, onde não se permite a utilização de quimioterápicos.

## CONCLUSÃO

Os extratos de *Punica granatum* L., principalmente o obtido da casca do fruto seco, demonstram atividade inibitória, *in vitro*, sobre a multiplicação da bactéria *S. aureus*, evidenciando a potencialidade de seu uso como opção terapêutica para o controle da mastite bovina.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos.

---

**ABSTRACT:** Bovine mastitis is considered important disease causing major economic losses in dairy herds. Antimicrobial drug can promote resistance, chemical residues in food and environmental contamination. The purpose of this study was to evaluate the antibacterial activity *in vitro* of pomegranate extract on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk, evaluate its antioxidant activity, and quantify levels of total phenols and flavonoids of the different extracts used. Aqueous extracts were used in nature and dry, from the peel of the fruit (EAC) and leaves (EAF). Additionally, it was evaluated the antioxidant activity (AA%), total phenols and flavonoids. Milk samples were inoculated, incubated, and the colonies were characterized as *Staphylococcus aureus* were adjusted to 1.0x10<sup>6</sup> UFC/mL in the 6 standard of the MacFarland scale. The sensitivity of the microbial isolates were determined in quintuplicate, in disk diffusion test. The minimum inhibitory concentration was determined by visible inhibition zone greater than 15mm. The results were evaluated by ANOVA, Tukey 5%, using the program SISVAR 5.3 - DEX / UFLA. Results implied that the aqueous extract from the bark of dried fruit was capable of inhibiting bacterial growth at concentrations of 3%. The other treatments only showed this activity, from the concentrations of 15%, 20% and 30% for dry EAF, in nature EAC and in nature EAF, respectively. Regarding the action antioxidant of dry EAC, was not correlated with total phenols and flavonoids. Probably other alkaloids substances present in the extract studied, may have been responsible for this activity. It is concluded that extracts of *Punica granatum* L., especially those obtained by the shell of the fruit, showed inhibitory activity against *S. aureus*, indicating your use potential for the control of bovine mastitis.

**KEYWORDS:** Agroecology. Antibacterial. Mastitis. Organic animal production. Biodinamic production

---

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C.; SOARES, T. M. P.; SILVA, D. B.; SILVA, B. C. M.; ALMEIDA, P. N. M.; SANTOS, C. A. Atividade do tratamento de bioterápicos para mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 6, n. 2, p. 134-141, 2011.
- AL-ZAHRANI, S. H. M. Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of American Science**, New York, v. 8, n. 2, feb. 2012.
- ANDRADE, U. V. C. de. **Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras**. 2010. 85f. Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; Di STASI, L. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 4, p. 387-390, jun. 2006.

BLATT, J. M.; PIAZZA, C. E. Perfil de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* isolados em pacientes internados. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 129-131, abr-jun. 2004.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

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, 3 de maio 2006. Seção 1, p. 20-25.

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. Seção 1, p. 13-22.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLLO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A.M.; JAMAL, C. M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 631-636, out./dez. 2008.

BRIETZKE, A. L. Contribuição de células somáticas no controle de qualidade do leite: uma questão de saúde pública. Monografia apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como trabalho de conclusão do curso de graduação em Zootecnia. Marechal Cândido Rondon. 2004. 53p.

BRITO, J. R. F. ; BRITO, M. A. P. Mastite Bovina. In: BRESSAN, M. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Circular Técnica. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 2000. p. 7-15.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, set. 2008.

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988. 249 p.

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 “*in vitro*” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 111-114, abr-jun. 2006.

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**, Georgia, v. 37, n. 2, p. 287–295, 2005.

DRESCHER, G.; MATTIELLO, S. P.; PEIXOTO, R. M.; VARGAS, A. C.; MACIEL M. N.; COSTA, M. M. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 188-193, jan./mar. 2010.

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**, Basel, v. 14, n. 5, p. 1808-1817, may 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 1988. parte 1, v.4. 300

- 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*. In: ENCONTRO NORTE-MINEIROS DE BIÓLOGOS – AVANÇOS E PERSPECTIVAS, 5., 2008, Belo Horizonte: Faculdades Unidas do Norte de Minas - UNIMONTES, 2008. p. 1-3.
- FERREIRA, J. L.; LINS, J. L. F. H. A.; CAVALCANT, T. V.; MACEDO, N. A.; BORJAS, A. R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 2, p. 261-266, abr./jun. 2007.
- FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. L.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da  $\beta$ - lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 552-559, dez. 2010.
- FREITAS, J. A.; PEDROSO, S. C. S.; BARROSO, R.; AGUIAR, R. V.; MONTEIRO, F. J. C. Ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros bovinos e bubalinos no estado do Pará. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, v. 2, n. 52, p. 189-194, jul./dez. 2009.
- JARDINI, F. A. **Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã (*Punica granatum*, L). – avaliação in vivo e em culturas de células**. 2010. 26f. Tese de Doutorado em Ciências dos Alimentos – Curso de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- LANSKY, E. P.; NEWMANN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Einsteinweg, v. 109, n. 2, p. 177- 200, jan. 2007.
- 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**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 1000–1007, april 2008.
- 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**, London, v. 21, n. 3, p. 279-284, mar. 2003.
- MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, jan./mar. 2010.
- MEDEIROS, M. I. M.; SOUZA, L. C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da região de Cerqueira César – SP. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 580-585, mar./abr. 2009.
- 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**, Juiz de Fora, v. 64, n. 368, p. 66-71, mar-jun. 2009.
- MENEZES, S. M. S.; PINTO, D. N.; CORDEIRO, L. N. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 65, n. 11, p. 388-391, nov. 2008.
- 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**, California, v. 50, n. 1, p. 166-171, dec. 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) 1997 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: \_\_\_\_\_. Antimicrobial Susceptibility, is testing protocols, New York: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 4<sup>a</sup> ed, v. 6, 91p., M7-A4.

NEVES, P. B.; MEDEIROS, E. S.; SÁ, V. V.; CAMBOIM, E. K. A.; GARINO JÚNIOR, F.; MOTA, R. A.; AZEVEDO, S. S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 379-384, maio 2010.

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**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 201-207, abr./mai. 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**, Rio de Janeiro, v.31, n.2, p.104-110, fev. 2011.

Oxoid Manual. 2000. The oxide manual of culture media, ingredients and other laboratory services. Oxide limited, Basingstoke, Hampshire, England: Oxoid, 2000, p.20-207.

PEIXOTO, R. de M.; FRANÇA, C.A. de; SOUZA JÚNIOR, A.F.; VESCHI, J.L.A.; COSTA, M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n.9, p.735-740, set. 2010.

PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P.M.; ARAUJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 88-93, jan./mar. 2006.

PEREIRA, A. V.; RODRIGUES, O. G.; AZEVEDO, T. K. B.; BEZERRA, D. A. C.; LIMA, E. Q.; PEREIRA, M. S. V. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 105-111, mar. 2009.

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**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 52-58, jan. 2009.

RIBEIRO JÚNIOR, 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**, Salvador, v. 9, n. 4, p. 680-686, out/dez, 2008.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

SAEKI, E. K.; MELLO-PEIXOTO, E. C. T.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSO, P. F.; MONTEIRO, R. M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinária Basílica**, Brasília, v. 5, n. 3, p. 284-290, nov. 2011.

SANTOS, L. L.; COSTA, G. M.; PEREIRA, U. P.; SILVA, M. A.; SILVA, N. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus coagulase-negativa*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 1-7, jan. 2011.

- SCHALM O. W.; NOORLANDER D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of Animal Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 130, n. 5, p. 199-204, mar. 1957.
- SCHEREINER, F.; RETZLAFF, G.; SIQUEIRA, M. F. R.; REZENDE, E. C.; SIMÃO, L. C.; KOZLOWSKI-JUNIOR, V. A.; SANTOS, E. B. Uso do chá de *Punica granatum* (Romã) no controle da aderência de bactérias orais em ligaduras ortodônticas. **Revista Odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v. 18, n. 45, p. 56-61, mar. 2009.
- SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S.V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 209-212, abr/ jun 2008.
- TOZZETI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 6, n. 10, p. 1-7, jan. 2008.
- VOSS-RECH, D.; KLEIN, C. S.; TECHIO, V. H.; SCHEUERMANN, G. N.; RECH, G.; FIORENTIN, L. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of Salmonella. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 314-320, fev. 2011.
- WERKMAN, C.; GRANATO, D. C.; KERBAUY, W. D.; SAMPAIO, F. C.; BRANDÃO, A. A. H.; RODE, S. M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 104-111, jul. 2008.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Policy perspective on medicines: medicina tradicional necessidades crescentes y potencial. Geneva: World Health Organization, 2002. 6p.
- ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 56-65, mar. 2008.
- ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência**, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 65-70, jan./jun 2010.
- ZHISHEN, J. MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, London, [on line] v.64, n. 4, p. 555-559, mar. 1999.