

15492 - Extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolado de leite bovino

Hydroalcoholic extract of Punica granatum Linn. on Staphylococcus spp. isolated from bovine milk

MELLO-PEIXOTO, Erika Cosendey Toledo¹; MOREIRA, Giovanna Melatti Bermal²;
MATSUMOTO, Leopoldo Sussumu³; SILVA, Regildo Márcio Gonçalves⁴;
DOMINGUES, Paulo Francisco⁵

1 Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP, emellopeixoto@uenp.edu.br; 2 Universidade Estadual do Norte do Paraná- UENP, gimelatti@hotmail.com; 3 Universidade Estadual do Norte do Paraná Campus Bandeirantes - UENP, leopoldo@uenp.edu.br; 4 Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Campus Assis – UNESP, regildos@yahoo.com.br; 5 Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Campus Botucatu – UNESP, domingues@fmvz.unesp.br

Resumo

Mastite é caracterizada por inflamação mamária em resposta à infecção bacteriana. Objetivou-se verificar ação antibacteriana do extrato de romã sobre *Staphylococcus* spp. Amostras de leite foram semeadas e as colônias ajustadas a $1,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ ao padrão nº 6 da escala de MacFarland. A sensibilidade dos isolados foi determinada por difusão em discos e a concentração inibitória mínima foi determinada pelo halo de inibição superior a 15 mm. Os extratos foram avaliados pelo método ANOVA e teste de Tukey 5%. Adicionalmente avaliou-se atividade antioxidante, teores de fenóis e flavonoides totais. O crescimento bacteriano foi inibido e a ação antioxidante foi verificada a partir de 50 µg.mL⁻¹. Porém, não foi possível correlacionar esta atividade aos teores de fenóis e flavonoides totais, provavelmente outras substâncias presentes foram responsáveis pela ação antioxidante. Conclui-se que o extrato hidroalcoólico de romã apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus* spp.

Palavras-chave: mastite; plantas medicinais; produção orgânica; romã

Abstract:

Mastitis is characterized by mammary inflammation in response to bacterial infection. The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of pomegranate extract on Staphylococcus spp. The milk samples were plated and the colonies were adjusted to 1.0×10^6 UFC.mL⁻¹ to Standard nº. 6 McFarland scale. The sensitivity of the isolates was determined by disk diffusion and the minimum inhibitory concentration was determined by the halo of inhibition greater than 15 mm. The extracts were evaluated by ANOVA and Tukey test 5%. Additionally it was evaluated antioxidant activity, levels of total phenols and flavonoids. The bacterial growth was inhibited and the antioxidant activity was observed from 50 µg.mL⁻¹. However, it was not possible to correlate this activity to the levels of total phenols and flavonoids, probably other substances were responsible for antioxidant activity. It was concluded that the hydroalcoholic extract of pomegranate has antimicrobial activity against Staphylococcus spp.

Keywords: mastites; medicinal plants; organic production; pomegranate

Introdução

Mastite bovina é uma doença multifatorial, caracterizada por uma inflamação da glândula mamária. Frequentemente ocorre em resposta à infecção bacteriana, porém pode ser causada por outros micro-organismos, como fungos, vírus e leveduras (TOZZETTI et al., 2008). Compromete a qualidade do leite pelo risco de

veiculação de agentes patogênicos, causando grandes perdas na produção, tanto em propriedades leiteiras como em laticínios. O tratamento usual a base de antimicrobianos químicos causa risco por determinar resíduos no leite, tornando-se inapropriado para o consumo. Assim, verificou-se crescente busca por medicamentos naturais.

Nos últimos anos, o aumento da procura por produtos orgânicos vem se intensificando. A utilização de plantas medicinais vem 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 (DOMINGUES et al., 2012). A utilização de 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.

Punica granatum Linn. conhecida, da família Punicaceae, é cultivada mundialmente. Foram demonstradas propriedades antimicrobianas do extrato de romã (MOORTHY et al., 2013), inclusive sobre isolados de *Staphylococcus aureus* (SILVA et al. 2008). Os principais constituintes da romã são alcaloides (peletierina, isopeletierina, metilpeletierina), taninos, compostos fenólicos (antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos) e flavonoides. Estas substâncias são frequentemente relacionadas com as atividades terapêuticas registradas. Propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias, apresentadas pelos extratos de romã, são particularmente importantes para o tratamento da mastite bovina.

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

Metodologia

As romãs foram colhidas ao final da manhã (no município de Bandeirantes – PR), higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e secas com papel toalha. As cascas dos frutos foram secas em estufa com ventilação forçada de ar à 40°C e maceradas manualmente. Para confecção do extrato hidroalcoólico à 10% (EHA), adicionou-se 190mL de álcool P.A. e 80mL de água destilada, em 30g de casca. Após agitação mecânica constante, durante 24 horas, realizou-se filtração à vácuo. Este procedimento foi realizado por 3 dias consecutivos, sendo que a cada filtração, adicionou-se solução hidroalcoólica conforme volume supracitado. Realizou-se concentração por rotaevaporizador (60°C), secagem em estufa (37°C por 24 horas), congelamento e liofilização do extrato.

As amostras de leite foram coletadas a partir de fêmeas bovinas portadoras de mastite subclínica. Esses animais foram previamente selecionados a partir do teste de Tamis e Califórnia Mastite Teste (CMT), a fim de se diagnosticar mastite clínica e subclínica respectivamente. Somente as amostras de leite que apresentaram positividade para o CMT, foram utilizadas pelo presente estudo. O CMT foi considerado positivo quando apresentou uma ou mais cruces (SCHALM & NOORLANDER, 1957). Adicionalmente realizou-se Contagem de Células Somáticas

(CCS) e análise microbiológica. Para tanto, as amostras de leite de cada quarto mamário, foram colhidas antissepticamente, acondicionadas em caixa isotérmica, transportadas sob refrigeração (aproximadamente 4°C) até o laboratório de microbiologia da UENP.

Os *Staphylococcus* sp. foram isolados utilizando meio Ágar Baird Parker®, enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito. Incubou-se à 37°C por 48 horas de acordo com OXOID (2000). As colônias foram observadas quanto à morfologia e aspectos como coloração cinza-negra, brilhante, convexa, com zona de precipitação circundada por halo claro de 2-5mm. As colônias foram isoladas em ágar-sangue e observadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise. Os micro-organismos foram avaliados pela coloração de Gram, prova de coagulase, catalase, uréase, e classificados quanto à resistência à novobiocina (SCHLEIFER & KLOOS, 1975). O teste de sensibilidade foi determinado pela técnica de difusão em placas de Ágar Mueller-Hinton. As colônias foram inoculadas em suspensão salina estéril a 0,85%, e por meio de espectrofotometria de luz, os inóculos foram ajustados em concentração celular entre 0,40 e 0,49nm de absorvância, com comprimento de onda de 600nm, criando a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/ mL⁻¹. Assim, apresentaram turvação ajustada ao padrão nº6 da escala de MacFarland (STANDARDS, 1997).

A atividade antibacteriana foi avaliada em quintuplicata, utilizando discos de papel filtro (Whatman nº1), impregnados com 40µL do extrato EHA, nas seguintes concentrações conforme Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações das diluições do extrato hidroalcoólico de casca de romã a 10%, empregadas nos testes antimicrobiano em difusão em disco

DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO
INICIAL	4 mg/ml
1:2	2 mg/ml
1:4	1 mg/ml
1:8	0,5 mg/ml
1:16	0,25 mg/ml
1:32	0,125 mg/ml
1:64	0,0625 mg/ml

As placas foram então incubadas (37°C por 24h) e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) correspondeu à menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano; considerando-se halo inibitório superior a 15mm. Complementarmente, foram avaliados controle positivo (ampicilina-10µg, sulfamitoxazol e trimetoprim- 25 µg, penicilina-10 µg, eritromicina-15 µg, oxacilina-1µg, cloranfenicol-30 µg, e vancomicina-30µg) e controle negativo utilizando discos estéreis. As variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O EHA foi avaliado quanto à atividade antioxidante, teores de fenóis e flavonoides totais; utilizando-se espectrofotometria UV-Visível. O extrato foi diluído nas concentrações: 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 µg para 1mL, e avaliado em

triplicata. A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade doador de H+ para o radical estável DPPH. (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com a metodologia BLOIS (1958). Para a quantificação dos fenóis totais foi utilizado o método *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico), e os teores de flavonoides foram determinados segundo a metodologia de ZHISHEN et al. (1999).

Resultados e discussões

Para o rebanho utilizado, foi observada apenas ocorrência de mastite subclínica, em 69% dos animais investigados. Este resultado corrobora aos registros anteriores, que apontaram esta forma como a mais frequentemente encontrada, quando comparada à forma clínica da doença (MELLO PEIXOTO et al., 2009). A CCS apresentou em média $838,64 \times 10^3$ e as análises microbiológicas identificaram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus coagulase negativa*.

O EHA inibiu o crescimento bacteriano a partir da concentração de 4mg/mL, verificando-se que quanto mais concentrado o extrato, maior o halo de inibição. Todas as concentrações proporcionaram halo de inibição maior que 15mm (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das médias (mm) dos halos de inibição bacteriana sobre *Staphylococcus* sp, observados para no tratamento com Extrato Hidroalcoólico a 10% de romã

Conc. Extrato	Halo de Inibição (mm)				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus Coagulase Negativa</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		
			1	2	3
4 mg/ml	32,7 ^a	32,7 ^a	29,7 ^a	23,7 ^{bcd}	37,0 ^a
2 mg/ml	27,7 ^b	31,3 ^{ab}	27,7 ^a	22,3 ^{cd}	35,3 ^a
1 mg/ml	26,3 ^{bc}	30,7 ^{ab}	25,3 ^b	26,7 ^a	30,7 ^b
0,5 mg/ml	25,7 ^c	28,0 ^b	24,0 ^{bc}	25,0 ^{ab}	27,3 ^c
0,25mg/ml	22,0 ^d	27,7 ^{bc}	23,0 ^c	24,3 ^{abc}	24,3 ^d
0,125 mg/ml	21,3 ^d	23,3 ^c	18,0 ^d	21,7 ^d	24,3 ^d
0,0625 mg/ml	16,3 ^e	9,3 ^d	10,0 ^e	17,3 ^e	16,0 ^e

*Médias seguidas de mesma letras minúsculas na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto aos tratamentos controle positivo, os mais eficientes foram sulfamitoxazol/trimetoprim, penicilina, eritromicina, cloranfenicol, oxacilina, ampicilina e vancomicina. Ao contrário, o grupo controle negativo não apresentou ação inibitória, tão pouco interferência no crescimento microbiano.

O extrato EHA apresentou atividade antioxidante a partir da concentração de 50µg/mL (Tabela 3), porém Entretanto, a atividade antioxidante não foi correlacionada aos teores de fenóis totais e flavonoides. Talvez outras substâncias alcaloides presentes no extrato estudado, possam ter sido as responsáveis pela atividade antioxidante verificada.

Tabela 3. Valores médios referentes à atividade antioxidante (AA%) para o Extrato Hidroalcoólico de romã a 10%.

Concentração	(AA%)
25 µg/mL	-
50 µg/mL	2,17
75 µg/mL	1,96
100 µg/mL	31,27
250 µg/mL	33,94
500 µg/mL	64,01
1000 µg/mL	77,79

Conclusões

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 Fundação Araucária, CAPES, CNPq, e aos Ministérios MCTI, MDA, MAPA, MPA e MEC pelo apoio financeiro que foi essencial para a realização deste trabalho.

Referências bibliográficas:

- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.
- DOMINGUES, B.S.L. et al. A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar, **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 490-501, 2012.
- MELLO-PEIXOTO, E.C.T. et al. Incidência de mastite bovina em animais homeopatizados. **Instituto Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 368, p.66-71, 2009.
- MOORTHY, K. et al. Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n.9, p.474-479, 2013.
- OXOID MANUAL. **The oxide manual of culture media, ingredients and other laboratory services**. Oxide limited, Basingstoke, Hampshire, England: Oxoid, 2000, p.20-207, 2000.
- SCHALM, O.; NOORLANDER, D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199, 1957.
- SCHLEIFER, K.H.; KLOOS, W.E.A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 337-338, 1975.
- SILVA, M.A. et al. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p. 209-212, 2008.
- TOZZETTI, D.S. et al. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n.10, 2008.