

15497 - Extrato aquoso de *Punica granatum* Linn. no tratamento de mastite bovina subclínica

Aqueous extract of Punica granatum Linn. in the treatment of bovine mastitis subclinical

MELLO-PEIXOTO, Erika Cosendey Toledo¹; MOREIRA, Giovanna Melatti Bernal²; FIGUEIREDO, Amanda³; MATSUMOTO, Leopoldo Sussumu⁴; SILVA, Regildo Márcio Gonçalves⁵; DOMINGUES, Paulo Francisco⁶

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 ffigueiredo.amanda@gmail.com , 4 Universidade Estadual do Norte do Paraná Campus Bandeirantes – UENP leopoldo@uenp.edu.br ; 5 Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Campus Assis – UNESP, regildos@yahoo.com.br; 6 5 Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Campus Botucatu – UNESP, domingues@fmvz.unesp.br

Resumo

Mastite bovina é caracterizada por inflamação da glândula mamária que ocorre geralmente em resposta à infecção bacteriana, comprometendo quali-quantitativamente a produção leiteira. Objetivou-se verificar ação do extrato aquoso de romã sobre fêmeas bovinas portadoras de mastite subclínica. Foram utilizados animais da raça Jersey e seus cruzamentos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos: animais testemunha e tratados por 10mL, via intramamária, ao final das ordenhas, por três dias consecutivos. Foram realizados o teste de Tamis, Califórnia Mastite Teste, contagem de células somáticas e análise microbiológica do leite. Levando-se em consideração o fato dos animais serem portadores de mastite subclínica de grau três, em todos os tetos, talvez maior tempo de tratamento seja necessário. Conclui-se que, o extrato aquoso de *Punica granatum* Linn., para as condições avaliadas, não apresentou benefícios terapêuticos para o controle da mastite subclínica bovina.

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

Abstract

Bovine mastitis is characterized by inflammation of the mammary gland that usually occurs in response to bacterial infection, compromising qualitatively and quantitatively the milk production. The present study aimed to verify the action of aqueous extract of pomegranate in bovines presenting subclinical mastitis. Animals of the Jersey breed and their crosses were allotted randomly into two groups: control animals and treated with 10mL via intramammary, at the end of milking, for three consecutive days. It was performed Tamis Test, California Mastitis Test, somatic cell count and milk microbiological analysis. Considering the fact that the animals were suffering from subclinical mastitis grade three, in all teats, longer treatment may be necessary. It was concluded that the aqueous extract of Punica granatum Linn., at the conditions evaluated, showed no therapeutic benefit for the control of bovine subclinical mastitis.

Keywords: mastites; medicinal plants; organic production; pomegranate

Introdução

A mastite bovina continua sendo considerada como principal doença da bovinocultura leiteira. Representa um dos fatores que mais reduz a qualidade e a

quantidade do leite. Alterações na composição do leite causam queda no rendimento industrial, prejudicando a fabricação de derivados (HOLANDA JR., et al. 2005).

Esta doença pode ser classificada como clínica, quando observa-se sinais clínicos, ou subclínica, na ausência destes. O controle e erradicação da forma subclínica, são um dos grandes desafios dos produtores de leite, uma vez que seu diagnóstico necessita de exames complementares. Além disso, esta forma apresenta maior prevalência nos rebanhos leiteiros, quando comparada a forma clínica da doença (MELLO-PEIXOTO et al.; BAN).

Como tratamento para mastite clínica, utiliza-se frequentemente antimicrobianos químicos, que determinam presença de resíduos medicamentosos e assim, descarte do leite (BRASIL, 2002). Além disso, o excessivo uso de antimicrobianos sem testes preliminares de sensibilidade, resulta em tratamentos inadequados, persistência, agravamento da doença, além de resistência microbiana.

Em relação ao tratamento da mastite subclínica, a situação é ainda pior, uma vez que normalmente não se institui o tratamento durante a lactação, devido à baixa eficácia da antibioticoterapia. Isto se deve ao fato, de que um dos microorganismos mais incriminados na mastite subclínica é o *Staphylococcus aureus* (SAEKI et al., 2012). Este microorganismo possui a capacidade de sobrevivência intracelular, assim o antibiótico não atinge o foco da infecção (SILVA et al., 2012). Dessa forma, esses animais portadores de mastite subclínica permanecem sem tratamento, porém participando das ordenhas, sendo fonte de contaminação e disseminação da doença no rebanho. Dessa forma, o produtor busca soluções naturais que possibilitem tartar a doença, porém sem gerar descarte do leite (ALMEIDA et al., 2011).

Punica granatum Linn., 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 vivo*, do extrato aquoso da casca do fruto da romã no tratamento de mastite subclínica bovina.

Metodologia

As romãs foram colhidas ao final da manhã, no município de Bandeirantes – PR. Foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e secas com papel toalha. Para a confecção do extrato aquoso de *Punica Granatum* Linn. (EAPg) as cascas dos frutos foram picadas e adicionadas à água filtrada e fervida. Avaliou-se este extrato nas concentrações de 10% e 50%. Após realizou-se trituração mecânica e aquecimento em banho-maria por 60 minutos à 70°C. Posteriormente, o extrato foi

filtrado, acondicionado em frasco de vidro âmbar, e armazenado sob refrigeração de aproximadamente 4°C.

Para o desenvolvimento do ensaio *in vivo*, foram utilizados animais em lactação, da raça Jersey e seus cruzamentos, provenientes de rebanho comercial oriundos da propriedade Santaneza. Esta propriedade encontra-se no município de Chavantes, região Sudoeste do estado de São Paulo, na divisa com o estado do Paraná. Localiza-se em Latitude 23° 02' 20" Sul e Longitude 49° 42' 34" Oeste. A altitude do município é de 563 metros acima do nível do mar. O Clima da região é o subtropical com precipitação média anual de 1800 a 2500 mL de chuva concentrados 70% no período de Setembro a Março. O sistema de ordenha é mecânica, tipo balde ao pé. Os animais são ordenhados duas vezes ao dia, com intervalo de oito hora; sendo mantidos em condições de pastagens com suplementação de concentrado ao cocho. O presente ensaio ocorreu no mês de Janeiro do presente ano.

Inicialmente os animais foram avaliados quanto à incidência de mastite bovina. Foram realizados o teste de Tamis (teste da caneca telada de fundo preto), Califórnia Mastite Teste (CMT), contagem de células somáticas (CCS) e análise microbiológica do leite. No preparo para a coleta, os tetos foram secos com papel toalha, e aqueles sujos foram lavados com água e posteriormente secos da mesma forma.

Para diagnosticar mastite clínica foi utilizado o teste de Tamis. As amostras foram coletadas a partir dos três primeiros jatos de leite, de cada teto, e observadas em um recipiente de fundo preto. Alterações como presença de pus, grumos de fibrina e sangue, são indicativas de mastite clínica.

Após o teste de Tamis, realizou-se o CMT de acordo com SCHALM & NOORLANDER (1957), a fim de se diagnosticar a forma subclínica da mastite. Coletou-se em raquete plástica própria, 2 mL de leite de cada quarto mamário, e adicionou-se, em igual volume o reagente (Lauril Sulfato de sódio a 3% e Púrpura de bromocresol. Procedeu-se movimentos circulares, durante aproximadamente 20 segundos. O resultado foi classificado como negativo na ausência de reação, ou positivo de acordo com a formação de gel (1 ou +), formação mais espessa com mamilo central (2 ou ++) e formação de gel muito espesso aderente ao fundo da raquete (3 ou+++).

Para a CCS as amostras do leite, de cada quarto mamário, foram coletadas e acondicionadas em frascos identificados contendo o conservante Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol). Conservados à temperatura ambiente, este material foi encaminhado ao laboratório de análise de leite na UNESP, *Campus* de Botucatu.

Para as análises microbiológicas do leite, foram coletadas amostras de cada quarto mamário positivo para o teste de CMT. A extremidade dos tetos foram higienizados previamente com gaze de algodão umedecido com álcool 70%, e o leite foi coletado após os exames supracitados e imediatamente antes da ordenha. Utilizou-se tubos *Falcon* estéreis, sendo posteriormente acondicionados em caixa isotérmica,

transportadas sob refrigeração de aproximadamente 4°C, até o laboratório de microbiologia da UENP.

Para a avaliação do extrato aquoso EAPg, foram selecionados oito animais, portadores de mastite subclínica, grau equivalente à três cruces em todos os tetos. Esses animais foram distribuídos, em igual número (quatro animais), aleatoriamente entre os tratamentos: extrato EAPg e tratamento controle testemunha, cujos animais não foram submetidos à qualquer tipo de tratamento. Para o tratamento EAPg foram utilizados 10mL, por via intramamária, em todos os tetos, duas vezes ao dia, imediatamente após a realização das ordenhas. Este procedimento foi realizado por três dias consecutivos. Realizou-se após cada aplicação, massagem ascendente da extremidade do teto em direção ao úbere.

Resultados e discussões

Para o presente rebanho avaliado, nenhum animal apresentou resultado positivo para mastite clínica. Porém, 69% dos animais apresentaram diagnóstico positivo para mastite subclínica, em pelo menos um dos tetos. Este resultado corrobora com registros anteriores, que apontaram a mastite subclínica como a forma mais frequentemente encontrada, se comparada à forma clínica da doença (FONTANA et al., 2010; MELLO PEIXOTO et al., 2009).

Em relação à CCS, para os animais selecionados (portadores de grau 3 no CMT), verificou-se média de $3,758 \times 10^6$. As análises microbiológicas apresentaram média de isolamento de bactérias de 2,48 LogUFC.mL⁻¹ de cocos Gram positivos. Foram identificados cinco espécies, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus saprophyticus*. Em concordância aos resultados apresentados por Marques et al. (2013), Mello-Peixoto et al. (2009), Ribeiro et al. (2012) e Saeki et al. (2012), o *Staphylococcus aureus* destacou-se como principal agente etiológico da forma subclínica da doença.

Para as condições avaliadas, não foi possível observar efeito dos tratamentos EAPg 10%, assim como EAPg 50%, sobre a ocorrência de mastite subclínica. Os animais permaneceram apresentando grau três para o CMT após três dias de tratamento. Esse período de tratamento foi inicialmente planejado, baseando-se na terapêutica rotineiramente instituída para produtos comerciais indicados nos casos de mastite clínica. Levando-se em consideração o fato dos animais serem portadores de mastite grau três, categorizada como de maior gravidade para a forma subclínica, talvez maior tempo de ação seja necessário para que se pudesse observar os resultados da atividade antibacteriana da romã. Outro fator que provavelmente influenciou esses resultados, refere-se ao fato de que os *Staphylococcus aureus* formam biofilmes em tecidos infectados, protegendo-os da ação fagocitária do sistema imunológico, contribuindo assim para sua alta prevalência e resistência aos antimicrobianos utilizados (FONTANA et al., 2010; MARQUES et al., 2013). Raza et al. (2013) relataram que 85% a 98,9% das estirpes, por eles avaliadas, produziram este biofilme, prejudicando a resposta imunológica dos animais e favorecendo a persistência da mastite subclínica. Silva (2012) considerou ainda, a formação de abscessos na glândula mamária que dificultam o processo de cura e diminuem a produção leiteira.

Cabe ressaltar que a atividade antibacteriana do EAPg, foi verificada em ensaio previamente realizado *in vitro* (SILVA et al., 2013). Foi possível registrar ação antibacteriana em extrato aquoso da casca de romã, *in natura*, a partir de 25%. Utilizou-se colônias de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir do leite desses mesmos animais. As colônias foram ajustadas a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL ao padrão nº6 da escala de MacFarland e a sensibilidade dos isolados microbianos foi determinada, pela técnica de difusão em discos, considerando-se como concentração inibitória mínima aquela determinada pelo halo de inibição superior a 15 mm.

Conclusões

O extrato aquoso de *Punica granatum* Linn., para as condições avaliadas não apresentou benefícios terapêuticos para o controle da mastite subclínica 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:

- BANDEIRA, F. et al. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região Sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 01-06, 2013.
- 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.
- HOLANDA JR. et al. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá – Minas Gerais, Brasil. *Archivos Latinoamerican Product Animal*, v.13, n.2, p.63-69. 2005.
- 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.
- SAEKI, E.K. et al. Mastite bovina Por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 284-290, 2012.
- 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.
- 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.
- SILVA, E. R. D. Produção De Hemolisinas Por *Staphylococcus Aureus* Isolados De Casos De Mastite Bovina Subclínica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 118-123, 2012.
- SILVA, B.T. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. **Bioscience Journal**, v.29, n.4, p. 974-984, 2013.