

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *PUNICA GRANATUM* CONTRA *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVO

Karoliny Gonçalves Baudson¹
Rhillary Medeiros Fonseca Da Silva¹
Nathan Passos dos Santos¹
Leandro Silva de Araújo²

leandro2506@yahoo.com.br

ÁREA DE CONHECIMENTO: Ciências da Saúde

RESUMO

Staphylococcus são bactérias gram positivas, com forma de cocos isolados, em pares ou agrupados. Essa bactéria causa diversas enfermidades em humanos, como pneumonias, bacteremias e infecções de pele. Em animais, causa piodermites, endometrite e síndrome do choque tóxico. A mastite em bovinos, causada por *S. aureus*, possui alta prevalência, sendo necessária grande atenção a essa infecção, pois gera prejuízo aos produtores e oferece risco à saúde pública. A *Punica granatum*, conhecida como romã, possui em sua composição grande quantidade de flavonoides e juntamente com seu fruto, cascas, caule e flores são indicados para o tratamento de processos inflamatórios e infecções, abscessos em pele, cólicas, diarreia de origem bacteriana e parasitária. Neste estudo foi avaliada a eficácia, *in vitro*, do extrato hidoalcoólico, a 7% e a 3,5%, da romã contra *Staphylococcus* coagulase positivo, isolados de amostras de leite vindas de vacas com mastite clínica e subclínica. Os resultados sugerem presença de atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de romã, nas diferentes concentrações utilizadas, contra *Staphylococcus* coagulase positivo. Todas as cepas mostraram resistência às bases comerciais, sendo elas: amoxicilina+clavulanato, sulfazotrim, eritromicina, gentamicinam, amoxicilina, cefalexina, imipenem e doxiciclina. Ressalta-se a potencial atividade antimicrobiana do extrato de *P.granatum*, mesmo que em pequenas concentrações.

PALAVRA CHAVE: antibacterianos; *Punica granatum*; fitoterapia; *Staphylococcus aureus*.

¹ Acadêmico do 10º período do curso de Medicina Veterinária da Univértix – Centro Universitário.

² Graduado em Medicina Veterinária, com Mestrado e Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva com foco em Imunologia e Parasitologia pela Universidade Federal de Viçosa. Professor e Coordenados do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário – Univértix

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro, em 2020, possuía 218.150.298 cabeças, sendo 16,3 milhões o número de vacas ordenhadas no país e, em Minas Gerais (MG), 3,1 milhões (IBGE, 2020a; IBGE, 2020b). O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo, produzindo 34 bilhões de litros de leite, sendo Minas Gerais o maior produtor nacional, gerando em média 9,4 bilhões de litros de leite (BRASIL, 2022). O setor emprega 1,2 milhões de trabalhadores diretos, gerando trabalho e grande renda aos produtores desta região, o que confere ao estado o valor bruto da atividade leiteira em torno de 21,4 bilhões de litros de leite (IBGE, 2020c).

O rebanho leiteiro é extremamente acometido por mastites, tanto clínicas como subclínicas, em todas as regiões. O tratamento convencional da mastite é realizado com uso de antimicrobianos específicos para o agente causador, porém, muitos produtores ignoram o uso correto desses medicamentos e os administram de forma exacerbada e indiscriminada. Os bovinos são submetidos frequentemente a esses tratamentos, o que promove uma seleção genética e o surgimento de populações microbianas resistentes aos fármacos (KRUMMENAUER; PONZILACQUA; ZANI, 2019).

Além do mencionado, outros problemas estão relacionados à utilização desses medicamentos, como o resíduo no leite, que inviabiliza a comercialização do produto antes de um período de carência, reduzindo a lucratividade do produtor (SILVA *et al.*, 2013). Logo, os medicamentos encontrados no mercado estão perdendo sua eficácia, trazendo consequências quantitativas e qualitativas para sua ação e, concomitantemente, acarretando riscos à saúde pública (KRUMMENAUER; PONZILACQUA; ZANI, 2019).

Atualmente procura-se formas alternativas para tratar doenças causadas por bactérias, como o uso de fitoterápicos. A fitoterapia é baseada no uso de plantas, vegetais ou extratos naturais para tratamento e prevenção de patologias (TEXEIRA, 2012). A planta *Punica granatum*, comumente conhecida como Romã, possui

propriedades antibacteriana e antiinflamatória (ANDRADE *et al.*, 2018), atividade no combate a fungos e vírus, além de ação adstringente, antioxidante, anti-helmíntica e antidiarreica (CUNHA, 2015).

A utilização da Romã para o tratamento da mastite com produtos naturais pode possibilitar a redução do uso errôneo de antimicrobianos, dando qualidade de vida aos animais e colaborando com a produção de leite (MOREIRA *et al.*, 2014). Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da romã contra *Staphylococcus* coagulase positivo, um dos principais agentes causadores da mastite bovina.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

MASTITE

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária caracterizado por alterações físicas e químicas do leite, que pode causar alterações patológicas no tecido glandular (BENEDETTE *et al.*, 2008). É uma doença multifatorial de caráter complexo e que envolve diversos patógenos, fatores pertencentes ao animal e ao ambiente. O processo inflamatório pode ser de origem fisiológica, alérgica, traumática, metabólica e/ou infecciosa. Além disso, pode ter diversos tipos de apresentação, tais como subclínica, clínica ou crônica (MASSOTE *et al.*, 2019).

A principal porta de entrada para as bactérias causadoras de mastite é o esfíncter mamário. Se essa estrutura estiver íntegra, dificilmente o crescimento desses microrganismos terá sucesso. Dentre as principais bactérias relacionadas a essa infecção estão: *Streptococcus agalactie*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactie*, *Escherichia coli*, *Corinecbacterium bovis*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma*, alguns fungos, leveduras, algas e coliformes, sendo que o *Staphylococcus sp.* é o causador que aparece com mais frequência nos rebanhos (DUQUE; BORGES; PICCININ, 2005).

Essa enfermidade é a que mais acomete os rebanhos leiteiros em todo o mundo,
Anais do FAVE – Fórum Acadêmico da Univértix, Matipó, v.1, setembro, 2022.

causando grandes prejuízos econômicos para os produtores e laticínios, já que interfere diretamente na qualidade do leite. A mastite reduz a produção leiteira independentemente da sua forma de apresentação e intensidade, podendo, em alguns casos chegar à perda de um ou mais tetos acometidos (TOZZETTI; BATAIER NETO; ALMEIDA; PICCININ, 2008).

A mastite clínica apresenta alterações visíveis do úbere e do leite, podendo ser de diferentes gravidades, desde subaguda, aguda, super aguda, crônica a gangrenosa (MASSOTE *et al.*, 2019). Dependendo da sua gravidade, pode ter aparecimento de edemas, endurecimento, dor na glândula mamária, pus, grumos ou qualquer outra alteração das características do leite. Já a mastite na sua forma subclínica não apresenta alterações macroscópicas, apenas alterações na composição do leite, e não na glândula mamária (BENEDETTE *et al.*, 2008).

Um dos métodos de diagnosticar a mastite clínica é com o uso da caneca de fundo preto, onde será observado, nos primeiros jatos de leite, a mudança na sua coloração e a presença de grumos, podendo aparentar também uma consistência mais aquosa e sangue ou pus (MASSOTE *et al.*, 2019).

A mastite subclínica pode ser detectada através dos testes California Mastitis Test (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS) (BENEDETTE *et al.*, 2008). Na maioria das vezes, essa forma de apresentação não é observada pelos proprietários e funcionários das fazendas, já que não há alterações visíveis, porém, pode-se observar a diminuição na produção leiteira. Assim, a doença se espalha com facilidade pelo rebanho, uma vez que não são perceptíveis sinais clínicos, o que causa grande prejuízo econômico à fazenda produtora de leite (MASSOTE *et al.*, 2019).

Convencionalmente, a mastite é tratada com antimicrobianos. Diversos estudos apontam o aumento da resistência dos agentes contra os antimicrobianos, por isso é de grande importância o monitoramento do uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos, que é o principal fator para o crescimento da taxa de resistência. A adoção de técnicas de baixo custo, como a higienização de equipamentos, de

utensílios e de operadores/ordenhadores, a limpeza e desinfecção do úbere dos animais e a realização de pré-dipping e pós-dipping, ajudam significativamente na prevenção da contaminação dos quartos mamários (COSTA *et al.*, 2013).

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O antimicrobiano é uma substância responsável pela morte ou inibição da multiplicação de bactérias. Logo, é utilizado para o controle de doenças infecciosas (doenças causadas por microrganismos que levam a processo infeccioso). A aplicação desse tipo de medicamento é feita na agricultura, na medicina humana e na veterinária, a fim de minimizar e tratar afecções geradas por essas bactérias (AIRES, 2017).

Um grande desafio na medicina veterinária tem sido a resistência antimicrobiana, que é definida pelo ato de o microrganismo evitar a ação do antimicrobiano, resistindo à destruição e fazendo com que o medicamento seja ineficaz (SALES; SANTOS; ANDREAZZI, 2021). Esse fato já ocorre de maneira natural entre os microrganismos no ambiente (MUNITA; ARIAS, 2016, *apud* SILVA *et al.*, 2020) mas esse processo pode ser intensificado por diversos fatores, sendo um deles o uso indiscriminado de antimicrobianos.

Bactérias têm uma alta taxa de multiplicação e grande habilidade de adaptação ao ambiente. Uma das vantagens dessa capacidade é o aumento da população em curto período de tempo, podendo uma bactéria duplicar sua população em meia hora. Logo, a seleção natural possibilita a adaptação de bactérias, por meio de mutações, em meio desfavorável para seu crescimento, como meios com antimicrobianos, pois os antimicrobianos agem como seletores para essas transformações que as bactérias sofrem, conferindo a elas maior potencial para sobreviver no meio com antimicrobianos (IGLESIAS, 2019).

Na prática, a resistência ocorre por diversos fatores. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma das principais causas do crescimento de

resistência é o uso de forma errada dos antibacterianos. Erros como falha na prescrição médica, uso exagerado e desordenado tanto na medicina humana quanto na veterinária, falta de fiscalização na venda dos produtos, fácil acesso, contaminação de alimentos por uso de antimicrobianos na agropecuária de forma errônea, além dos resíduos vindos de propriedades por produtos de origem animal, como o leite, por exemplo (SALES; SANTOS; ANDREAZZI, 2021).

A falta de lançamentos de novos antimicrobianos no mercado agrava mais a situação, afetando o tratamento de doenças e dificultando a cura para certas doenças. O impacto desse problema é grave em locais onde não há tantos recursos. Segundo a OMS, praticamente todos os antimicrobianos lançados no mercado nas últimas décadas são variantes dos antimicrobianos descobertos em 1980 (ONU, 2021).

Conforme argumento do diretor de Coordenação Global de Resistência Antimicrobiana, Haileyesus Getahun, “as oportunidades emergentes da pandemia devem ser aproveitadas para trazer à tona as necessidades de investimentos sustentáveis em pesquisa e desenvolvimento de antimicrobianos novos e eficazes” (ONU, 2021, s/p). Em vista disso, é necessário que haja progresso nas linhas de pesquisa de novas formulações medicamentosas.

***Punica granatum* (ROMÃ)**

A *Punica granatum*, conhecida como romã, pertence à família *Punicaceae*. A romãzeira produz fruto arredondado com diversas sementes, de coloração avermelhada a amarela. Nessa planta há grande quantidade de taninos e fitoconstituintes, como: alcalóides, punicina e ácido gálico. O fruto, as suas cascas, ocaule, a raiz e as flores são indicados para o uso no tratamento de diversos processos inflamatórios e infecções por possuírem alcaloides (pelieterina, isopelieterina e pseudopelieterina) (LIMA; FREIRE; FARIAS, 2002). Sua folha é pequena, rígida, brilhante e membranácea. A romã é comumente usada pra tratar problemas de saúde em mucosas, infecções e abscessos em pele, cólicas, hemorroidas, bronquites,

faringites, laringites, diarreia de origem bacteriana e parasitária, infecções de vias urinárias e genitais, viroses em geral, afecções acometidas por fungos, conjuntivites, glossites e estomatites (RODRIGUES, 2006; *apud* NASCIMENTO JÚNIOR *et al.*, 2016).

Staphylococcus

É uma bactéria gram-positiva, caracterizada por cocos que podem se apresentar isolados ou aos pares, em cadeias curtas ou agrupados. O aspecto macroscópico da colônia em meio sólido, a presença de pigmento e a hemólise em ágar são características auxiliares na identificação destes microrganismos. Eles são imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e produtores de catalase (HIRAI, 2015).

Essa bactéria está entre os agentes que mais causam enfermidades em humanos, acarretando sintomas como pneumonias, bacteremias, infecções de pele e de tecidos moles, infecções relacionadas ao uso de próteses e cateteres venosos, e meningites (BRASIL, 2008).

Das 47 espécies relatadas, seis são capazes de produzir a enzima extracelular coagulase: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini* e *S. Lutrae* (EUZÉBY, 2011 *apud* SANTIAGO, 2019). Logo, elas são caracterizadas como coagulase positivas e consideradas patogênicas, uma vez que podem produzir enterotoxinas (SILVA *et al.*, 2015).

Dentro dessas espécies está o *Staphylococcus aureus*. Trata-se de microrganismos quimiorganotróficos, que apresentam metabolismo de carboidratos respiratórios e fermentativos. São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, que crescem em ambientes com temperaturas entre 18°C e 40°C, com elevador teor de cloreto de sódio (10%) (FREITAS *et al.*, 2021). Possuem aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, são microrganismos não esporulados, imóveis e podem apresentar diversos arranjos, na maioria das vezes, se agrupam em formato de cocos com arranjo

de *Streptococos* (LIMA *et al.*, 2015).

Tais bactérias possuem uma cápsula de polissacarídeo revestindo a cama externa da parede celular. A cápsula se torna uma forma de aumento de virulência, uma vez que pode inibir a fagocitose bacteriana. Sendo de importante destaque, na superfície externa da maioria das cepas de *S. aureus* contém o fator de coagulação coagulase ligada, que se liga ao fibrinogênio e o converte em fibrina insolúvel, o que possibilita a detecção desta espécie (LIMA *et al.*, 2015).

O *S. aureus* é um dos agentes mais comuns responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. As particularidades e aspectos do seu habitat fazem com que sua presença seja ampla na natureza, sendo transmissíveis aos alimentos por manipuladores, na maioria portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (STAMFORD; SILVA; MOTA; CUNHA NETO, 2006). Esse agente também é responsável por importantes afecções em animais, desde simples, como piodermites, edometrite, conjuntivite, onfalite, linfadenite e cistite, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite e síndrome do choque tóxico (BARBOSA *et al.*, 2019).

METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa descritiva e qualitativa, que foi submetida ao Comitê de Ética de Uso Animal da Univértix (CEUA).

Para a obtenção das amostras de *Staphylococcus* coagulase positivo, foram testadas para presença de mastite todas as vacas do Sítio Vale Verde em Bom Jesus do Galho – MG, no período de março a abril de 2022. As vacas eram de raça mestiça, todas em lactação e com idade de 3 a 9 anos.

Como método de diagnóstico da mastite clínica e subclínica, utilizou-se o teste da caneca de fundo preto, CMT (*California Mastite Test*) e exame clínico. O teste da caneca de fundo preto consiste na avaliação dos primeiros jatos de leite em um recipiente de fundo preto, quando é observado a coloração do leite, consistência e se há pus. (MASSOTE *et al.*, 2019).

O exame físico é feito a partir da inspeção do úbere (temperatura, aspecto, coloração, presença ou ausência de edemas e lesões), palpação dos tetos e mensuração de temperatura. Para realizar o CMT, retira-se um jato de cada teto na bandeja, no local correspondente ao teto, e adiciona-se o reagente até a marcação. O resultado desse teste é confirmado pela formação de um gel, podendo ser classificado em negativo, traço e positivo, com uma, duas ou três cruces (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Dos animais positivos para mastite clínica ou subclínica (uma a três cruces), foram coletadas amostras com 50 ml de leite em frasco estéril e transportadas para o laboratório de microbiologia do Hospital Veterinário do Centro Universitário Univértix, depois foram resfriadas em caixa de isopor com gelo e armazenadas na geladeira.

O extrato aquoso da *Punica granatum* na concentração de 7% foi manipulado pela farmácia São João, em Matipó – MG. No laboratório de microbiologia, o extrato foi diluído na proporção de 1:1 utilizando 2 ml de extrato e 2 ml de água destilada autoclavada, obtendo a concentração de 3,5%.

Para o isolamento de *Staphylococcus* coagulase positivo, as amostras foram inoculadas, com auxílio da alça de Drigalski, em placas de Petri com ágar manitol salgado (seletivo para isolamento de *Staphylococcus*, conforme Brito (2010)) e colocadas na estufa por 48 horas, a 37°C, em aerobiose para o crescimento bacteriano. Após o crescimento, analisou-se as placas para a mudança de cor, do vermelho para amarelo (BRITO, 2010), indicativo de *Staphylococcus*. A partir desse resultado, as colônias foram coletadas com auxílio de uma alça de platina e foram realizados os testes de catalase e coagulase.

As cepas identificadas como *Staphylococcus* coagulase positivo tiveram de 3 a 5 colônias diluídas em solução salina até a turbidez equivalente ao tubo número 5 da escala Mac Farland. As bactérias diluídas foram semeadas em placas com ágar Mueller Hinton, onde produziu-se um orifício de 60mm e adicionou-se 40 microlitros do extrato a 7% e a 3,5%, e depois foram incubadas na estufa por 24h.

Para identificação do perfil de sensibilidade das cepas utilizadas na avaliação

in vitro, cada uma foi submetida a teste de sensibilidade a antimicrobianos comerciais: Amoxicilina+clavulanato, Sulfazotrim, Eritromicina, Gentamicina, Amoxicilina, Cefalexina, Imipenem e Doxiciclina, sendo classificados quanto à sensibilidade pelos valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos em comparação com os padrões estabelecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

Após a coleta de dados, as informações foram digitalizadas, organizadas em uma planilha no programa Microsoft Office Excel 2019 e analisadas de forma descritiva. A presença e o tamanho de halos obtidos com os extratos foram comparados aos resultados observados frente aos antimicrobianos comerciais.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com o método de diagnóstico para mastite, dentre os animais testados, 10 resultados foram positivos para mastite, dos quais as amostras foram coletadas. Ao inocular as amostras em meio seletivo, obteve-se 6 placas com crescimento típico *Staphylococcus*, sendo 4 amostras positivas para testes de catalase e coagulase.

Ambas as concentrações mostraram formação de halos parciais de inibição, ou seja, é perceptível uma redução na densidade populacional bacteriana capaz de crescer na região de difusão do extrato sobre o ágar, sem, entretanto, inibir completamente o crescimento. Foi possível ainda observar diferença entre o diâmetro de acordo com a diluição utilizada. A avaliação dos medicamentos comerciais apresentou variação entre cepas de maior ou menor sensibilidade. Foi possível observar antimicrobianos que não apresentavam nenhuma atividade, antimicrobianos com atividade parcial, mas que permitiam o crescimento de colônias dentro da região delimitada do halo de inibição, o que significa presença de resistência, e antimicrobianos para os quais formou-se halo de inibição limpo, sem presença de colônias.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, a amostra 1 apresentou

resistência aos antimicrobianos: sulfazotrim, eritromicina, imipenem e doxiciclina; amostra 2: eritromicina, gentamicina e imipenem; amostra 3: eritromicina, gentamicina e doxiciclina; amostra 4: sulfaxotrim, amoxicilina e cefalexina. Dentre as 8 bases comerciais testadas, a melhor delas foi a amoxicilina+clavulanato, pois todas as amostras foram sensíveis a ela, e a pior foi a eritromicina, para a qual três das quatro amostras foram resistentes. Em relação às placas com extratos de *P. granatum*, notou-se halos nítidos, alguns até mesmo maiores que os observados para medicamentos comerciais, tanto em sua concentração a 7% quanto a 3,5%, porém todos permitiram o crescimento da cepa testada ao fundo (dentro da área delimitada do halo). O maior halo foi encontrado na concentração de 7% na amostra 3, e o menor halo também foi encontrado na mesma concentração, porém na amostra 4.

Tabela 1: Avaliação in vitro da atividade de antimicrobianos comerciais e extratos de *Punica granatum* contra 4 isolados de *Staphylococcus coagulase* positivo.

	AMC	SUT	ERI	GEN	AMO	CEF	IPM	DOX	Extrato 7% (mm)	Extrato 3,5% (mm)
1	S	R	R	S	I	I	R	R	32	28
2	S	I	R	R	I	I	R	I	33	45
3	S	S	R	R	I	I	S	R	50	32
4	S	R	I	S	R	R	S	I	20	25

Legenda: R- Resistente. I – Intermediário. S – Sensível. AMC – Amoxicilina + clavulanato. SUT – Sulfazotrim. ERI – Eritromicina. GEN – Gentamicina. AMO – Amoxicilina. CEF – Cefalexina. IPM – Imipenem. DOX – Doxiciclina. **Fonte:** elaborando pelos autores.

Embora a inibição observada pelo extrato seja apenas parcial, ao verificar que trata-se de cepas que já expressam mecanismos de resistência, sugere-se que o extrato exibe atividade antimicrobiana. Ainda não foram isolado princípios ativos da planta, que poderiam ser concentrados e ter sua atividade potencializada.

A ação da romã pode ser descrita pelos seguintes mecanismos: i) inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a agregação de enzimas; ii) ação dos taninos que estão na planta sobre a membrana celular dos microrganismos, modificando o seu metabolismo; iii) complexidade dos taninos com íons metálicos, diminuindo a

disponibilidade desses elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos (SANTOS *et al.*, 2014 *apud* LACERDA; BEGATI, 2018).

Nascimento Júnior *et al.* (2016) testaram a eficiência da cicatrização de feridas em ratos e concluíram que a casca da romã, por ser rica em polifenóis, possui um forte efeito antisséptico e antimicrobiano contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, o que corrobora o presente estudo, pois as cepas isoladas são gram-positivas.

Segundo Trindade, Fonseca e Juiz (2009), um estudo *in vitro* mostrou atividade antimicrobiana da tintura da casca de romã a 20%, frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Observou-se que o grupo controle C0 (tintura de *P. granatum* a 20,0%) apresentou halo de inibição de 16mm, o que mostra diâmetros próximos aos halos de 20mm do grupo controle de clorexidina a 12%, evidenciando o potencial dessa concentração frente a *S. aureus*. Os resultados dessa pesquisa, quando correlacionados ao presente trabalho, sugerem eficácia do extrato da romã, mesmo em baixas concentrações, pois apresentam valores de halos semelhantes.

Segundo Silva, Kowalski, Pagno e Piana (2020), a ação inibitória de antimicrobianos dos flavonoides é devida à alteração da permeabilidade de membrana e parede celular, na qual o mecanismo de atuação é atribuído a danos estruturais. Essa interação se dá por sua lipofilicidade, atribuída por grupos hidroxilas, conferindo apolaridade e propriedades ácidas fracas à molécula. Esse mecanismo inibe a entrega de energia à célula bacteriana, fator de ação que realiza a inibição quando testado em placas, no presente estudo.

O composto também inibe a síntese de ácidos nucleicos, reduzindo a produção de DNA e RNA bacteriano através do bloqueio da topoisomerase. Estudos realizados por Mori e Nishizawa (1987) mostraram que a síntese de DNA pode ser inibida em *Proteus vulgaris* e que a produção de RNA mais atingida é em *S. aureus*.

Pesquisas apontam que a neutralização dos fatores de virulência por flavonoides em bactérias conferem às células do organismo proteção (SILVA *et al.* 2020). Choi *et al.* (2007) comprovaram que a catequina polimerizada bloqueia o efeito

da toxina de *S. aureus*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tal inibição foi constatada nas placas-testes, onde houve observação de halos parciais.

De acordo com Monteiro, Albuquerque, Araujo e Amorim (2005), algumas bactérias são sensíveis aos taninos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido. Quando analisados e associados os dados dessa pesquisa com o presente estudo, é possível ver que mesmo baixas concentrações têm potencial efeito inibidor, tanto em bactérias quanto em fungos.

Argenta *et al.* (2012) descreveram o êxito do extrato de romã em bactérias cariogênicas. Notou-se que, nas diluições de 3%, houve um halo em média de 19 (\pm 3) e 7% de 28 mm (\pm 4), concentrações e halos próximos aos encontrados no presente trabalho. Os pesquisadores fizeram análise em bactérias semelhantes às deste estudo, pois bactérias gram-positivas fazem parte da formação de cáries, como *Streptococcus mutans* (SANTOS *et al.*, 2007).

Com relação à observação de cepas resistentes, conforme Andrade, Dias Filho, Mesquita e Rocha (2006), as cepas resistentes podem ser explicadas pelo uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) da classe de betalactâmicos na medicina veterinária, possibilitando a seleção de cepas resistentes pela eliminação de cepas sensíveis e, ainda, pela presença da betalactamase em algumas cepas do *S. aureus*. Segundo esses autores, a gentamicina foi o antimicrobiano de maior ação contra *Staphylococcus aureus* encontrado em seu experimento, o que contrapõe os resultados do presente estudo, apontando resultados insatisfatórios, pois a maioria das cepas foram resistentes à sua ação.

A gentamicina pertence ao grupo dos aminoglicosídeos e é um dos principais antimicrobianos utilizados como tratamento intramamários para mastite em vacas leiteiras durante a lactação (GUERRIRO; POLIZEL, 2020). Esse grupo de antimicrobianos age inibindo a produção proteica de agentes gram-positivos e alguns

gram-negativos. Esse medicamento tem atividade contra a bactéria testada, mesmo que na maioria das amostras não tenha tido diâmetro de halo suficiente para ser classificado como sensível, conforme exposto neste trabalho (LACERDA; BEGATI, 2018).

A eritromicina pertence ao grupo dos macrolídeos e seu mecanismo é baseado no empecilho da síntese proteica bacteriana. É bacteriostática e, em altas concentrações bactericidas, esse medicamento age predominantemente em bactérias gram-positivas (VICTOR, 2017). Em estudos feitos por Spinosa, Górnaiak e Bernardi (2011), notou-se que a resistência bacteriana é intermediada por plasmídeos, mas a mutação cromossômica que leva à alteração em ribossomos foi descrita, portanto, torna-se de uso exclusivo da medicina veterinária. As bases não apresentaram efeito contra as cepas, sendo que tal resistência foi demonstrada nos dados da Tabela 1.

O sulfazotrim (Sulfametoxazol-trimetoprim) pode ter efeito bacteriostático e bactericida, dependendo da forma administrada, podendo ser tóxico ao hospedeiros. Ele atua inibindo a enzima di-hidrofolato redutase. A resistência às sulfas ocorre de maneira lenta e gradativa, e acredita-se que ocorra por meio de plasmídeos, de modo semelhante aos macrolídeos (VICTOR, 2017). É possível observar esse efeito nos resultados obtidos nas placas, onde 2 das 4 amostras foram resistentes a esse medicamento.

Em relação à doxiciclina, é uma tetraciclina de 2º geração com ação bacteriostática. Há dois tipos de mecanismo de resistência das tetraciclinas: o efluxo de medicamentos e a proteção ribossomal, análogo aos macrolídeos (D'EL REY-DANTAS; FEIJÓ; NOGUEIRA; CURCIO, 2018). As doxiciclinas são medicamentos de eleição no tratamento de erliquioses em várias espécies, sendo eficiente no combate a bactérias intracelulares (DUMLER; BAKKER, 1995; NEER *et al.*, 2002; PAPICH, 2003). Porém, o uso exacerbado no tratamento contra essas bactérias gera grande resistência.

Os pontos citados neste estudo evidenciam o grande potencial, *in vitro*, do

Anais do FAVE – Fórum Acadêmico da Univértix, Matipó, v.1, setembro, 2022.

extrato de *Punica granatum* contra *Staphylococcus* coagulase positivo, sendo esse fitoterápico uma possível alternativa para a inibição do agente, mesmo na presença de cepas resistentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo sugerem atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de romã, em diferentes concentrações, contra *Staphylococcus* coagulase positivo. Entretanto, a ausência de atividade total deve ser avaliada por meio de novos estudos com concentrações distintas, de modo a alcançar atividade comparável às bases comerciais para as quais as cepas foram sensíveis. Ressalta-se que todas as cepas apresentaram resistência às bases comerciais, o que destaca a atividade alcançada pelos extratos, mesmo nas concentrações pequenas utilizadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- AIRES, C. A. M. **Resistência bacteriana aos antimicrobianos: o que você deve saber e como prevenir**. 2. ed. Rio de Janeiro: IOC/Fiocruz, 2017.
- ANDRADE, J. de O. *et al.* Utilização fitoterapica da romã (*Punica granatum L.*): uma revisão literária. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, 2018.
- ANDRADE, M. A.; DIAS FILHO, F. de C.; MESQUITA, A. J. de; ROCHA, P. T. Sensibilidade *in vitro* de staphylococcus aureus isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 53–57, 2006.
- ARGENTA, J. A. *et al.* Efeito do extrato de romã (*Punica granatum*) sobre bactérias cariogênicas: estudo *in vitro* e *in vivo*. **Arq Odontol**, Belo Horizonte, v. 48, n. 4, p. 218–226, 2012.
- BARBOSA, L. de O. M. *et al.* Staphylococcus aureus e sua importância em medicina veterinária. **Seminário de iniciação científica e seminário integrado de ensino, pesquisa e extensão**. UNOESC. Santa Catarina. 2019.

BENEDETTE, M. F. *et. al.* Mastite Bovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça, ano VI, v. 7, n. 11, p. 1-5, jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. BRAGA, A. *et. al.* (coord.). **MC boas práticas**. Brasil, 2008. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm. Acesso em: 6 jul. 2022.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Mapa do leite: Políticas públicas e privadas para o leite**. Brasil, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/portal-do-leite/mapa-do-leite/>. Acesso em: 4 jul. 2022.

BRITO, F. G. **MBiolog Diagnósticos**. Contagem - MG. 2010. Disponível em: http://mbiolog.com.br/produtos/Agar_Mueller_Hinton.pdf. Acesso em: 8 jun. 2022.

CLSI. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo**. 2005. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo4.pdf. Acesso em: 18 jun. 2022.

COSTA, G. M. da *et. al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil, **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

CUNHA, L. S. *et al.* Potencial antibacteriano da romã (*Punica granatum L.*). **Mostra Científica da Farmácia**, Vol 2, Número 1. Jun. 2015. Rio Grande do Sul.

D'EL REY-DANTAS, F. T.; FEIJÓ, L. S.; NOGUEIRA, C. E.W.; CURCIO, B. da R. Doxíciclina: uma revisão sobre particularidades e utilização clínica na espécie equina. **Science and animal health**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 101 – 113, 2018.

DUQUE, P. V. T.; BORGES, K. E.; PICCININ, A. Mastite bovina: descrição da doença e seus impactos na economia brasileira. **Simpósio de patologia veterinária do centro-oeste paulista**, São Paulo, v. 2, 2005.

FREITAS, G. *et. al.*, Uso de diferentes métodos no controle de desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*: em revisão da literatura. **Research, society and development**, Vargem Grande Paulista - SP, v. 10, n. 2, p.1, 8 fev. 2021.

GUERRIRO, B; POLIZEL, F Ciprofloxacina e Gentamicina são eficientes para tratamento das mastites em vacas de leite. **Ouro fino saúde animal**, 27 abr. 2020.

Disponível em: <https://www.ourofino Saud e animal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/ciprofloxa cina-e-gentamicina-sao-eficientes-para-t/>. Acesso em: 15 jun. 2022.

HIRAI, C. **A contaminação microbiana por cocos gram positivos**. [S.l], LabNetwork, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores agropecuários: Produção de leite (litros)**. 2020a. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/indicadores.html>. Acesso em: 24 nov. 2021.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Quantidade de vacas ordenhadas**. 2020b. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/94#resultado>. Acesso em: 4 jul. 2022.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Ranking - Pecuária - Rebanhos (2020), Bovinos (Bois e Vacas)**. 2020c. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>. Acesso em: 24 nov. 2021.

IGLESIAS, J. O. Comprendiendo la resistencia a antimicrobianos. **Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud (RIECS)**. Alcalá, v. 4, n. 2, p. 84 – 89, 2019.

KRUMMENAUER, A.; PONZILACQUA, B.; ZANI, J. L. Atividade antibacteriana de extratos naturais sobre agentes causadores de mastite bovina. **Journal of biology & pharmacy and agricultural management**, [s. l.], v. 15, n. 4, p.436-449, 2019.

LACERDA, J. B.; BEGATI, L. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Punica granatum* contra *Salmonella spp.*** ARAÚJO, L. S. de, 2018. 19 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado em Medicina Veterinária) - Faculdade vértice – Univértix, Matipó, 2018.

LIMA, E. de O.; FREIRE, K. R. de L.; FARIAS, N. M. P. de. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Punica granatum* L. (PUNICACEAE). **Infarma**. Brasília, v. 14, n. 9/10, p. 46-49, 2002.

LIMA, M. *et. al.*, *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. **Revista Uningá Review**, Maringá – PR, v. 21, n. 1, p. 32 – 39, jan. 2015.

MASSOTE, V. P. *et. al.* Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, Varginha, v.1, n. 1, p. 41-54, out. 2019.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. de; ARAÚJO, E. de L.; AMORIM, E. L. C. de Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892 – 896, 2005.

MOREIRA, G. M. B. *et al.* Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum Linn.* sobre *Staphylococcus spp.* isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 34(7):626-632. 31 jul. 2014.

MORI, S; NISHIZAWA, N. Methionine as a Dominant Precursor of Phytosiderophores in Graminaceae Plants. **Plant Cell Physiol**. setembro de 1987; Disponível em: <https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077388>.

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J. *et. al.* Estudo da ação da romã (*Punica granatum L.*) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 18, n. 2, p.423 – 432, 2016.

OLIVEIRA, V. M. *et. al.* **Como identificar a vaca com mastite em sua propriedade**: cartilhas elaboradas conforme a metodologia e-Rural. Brasília, DF: Embrapa, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140323/1/Cartilha-Mastite-completa.pdf>. Acesso em: 23 fev. 2022.

RODRIGUES, E. R. *et. al.* Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. XVI. *Punica granatum L.* **Investigação**: Revista Científica da Universidade de Franca (SP), Franca, v. 6, n. 1, p. 79-84, 2006.

SALES, F. A. de.; SANTOS, J. M. G. dos.; ANDREAZZI, M. A. Resistência Antimicrobiana em Animais. *In*: XI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica. **Anais Eletrônicos**. Universidade CESUMAR. Maringá – PR. Disponível em: <http://rdu.unicesumar.edu.br/bitstream/123>. Acesso em: 24 nov. 2021.

SANTIAGO, M. C. L. **Pesquisa de *Staphylococcus Coagulase Positiva* produtor da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em amostras de queijo minas artesanal**. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Monografia. Belo Horizonte, 2019.

SILVA, A. D. da; KOWALSKI, L.; PAGNO, A. R.; PIANA, M. Atividade antimicrobiana de flavonoides: uma revisão de literatura. **Revista interdisciplinar em ciências da saúde e biológicas**, Santo Ângelo - RS, v. 4, n. 1, p. 51 – 65, 2020.

SILVA, J. *et. al.* **Staphylococcus spp.**: incidência e surtos. 23. ed. Brasília – DF: Embrapa, 2015.

SILVA, R. A. da *et. al.* Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**. Rio de Janeiro, v. 44, n. 126, p. 607- 623, 2020.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Sociedade brasileira de ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas – SP, v. 26, n. 1, p. 41 – 45, 2006.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER NETO, M.; ALMEIDA, L. R. de; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas–revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça, ano VI, v. 6, n. 10, p. 1-7, jan. 2008.

TRINDADE, M. P.; FONSECA, L.; JUIZ, P. J. L. Atividade antimicrobiana da tintura da casca de romã (*Punica granatum*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*: estudo *in vitro*. **Revista brasileira de pesquisa e saúde**. Vitória, v. 11, n. 4, p. 49-54, 2009.

VICTOR, R. A. F. **Perfil de resistência aos antimicrobianos frente à pseudomonas aeruginosa isoladas de afecções oftálmicas em diversas espécies**: revisão sistemática. ANDRADE, A. L. de. (orientador). 2017. 24 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2017.