Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde

Carenn Rodrigues e Almeida Silva

Extrato de *Punica granatum* L. (romã): análise das propriedades para uso como sanitizante no manejo da ordenha bovina.

Rio de Janeiro

2024

Carenn Rodrigues e Almeida Silva

Extrato de *Punica granatum L*. (romã): análise das propriedades para uso como sanitizante no manejo da ordenha bovina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Profª Drª Maria Cristina de Assis
Coorientadora: Profª Drª Cristiane Pimentel Victório

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CZO

S586 Silva, Carenn Rodrigues e Almeida

Extrato de Punica granatum L. (romã): análise das propriedades para uso como sanitizante no manejo da ordenha bovina / Carenn Rodrigues e Almeida - 2024.
139 f.

Orientadora: Maria Cristina de Assis

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

1. Ciência e Tecnologia Ambiental - Teses. 2. Punica granatum - Teses. 3. Mastite bovina - Teses. 4. Desinfetantes – Teses. 4. Pré e Pós dipping – Teses. I. Assis, Maria Cristina de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDU 502

Bibliotecária Joice Soltosky Cunha CRB7-5946

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que cite a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Carenn Rodrigues e Almeida Silva

Extrato de *Punica granatum L*. (romã): análise das propriedades para uso como sanitizante no manejo da ordenha bovina.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 30 de agosto de 2024.

Banca Examinadora:

_____
Profª Drª Maria Cristina de Assis
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde - UERJ

_____
Prof Dr. Alexander Machado Cardoso
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde - UERJ

_____
Prof.ª Dr.ª Ida Carolina Neves Direito
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde - UERJ

_____
Vinícius Ribeiro Flores
Instituto Nacional de Tecnologia- INT

_____
Drª Dora dos Santos Costa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2024

DEDICATÓRIA

A Deus, meus pais e irmã com todo amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pela vida, pela saúde e pela força de persistir diante das adversidades e a minha família pelo apoio integral, companheirismo, pelas palavras de incentivo e por todas as manifestações de apreciação e orgulho.

Agradeço a Profª Drª Maria Cristina pelos votos de confiança, pela paciência e por acreditar no meu potencial e talento mesmo diante de tribulações e mudanças; e a agradeço pelas ricas oportunidades de sair da zona de conforto e tentar mais e melhor, o que proporcionou crescimento pessoal e profissional de forma simultânea.

Agradeço também a Profª Drª Ida Carolina e Profª Drª Cristiane Pimentel por terem assinado esse projeto junto a mim e minha orientadora, e a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Ambiental pela colaboração, hospitalidade, empatia e amabilidade.

Agradeço a minha banca examinadora, a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental e a Reitoria da UERJ-ZO pela rica oportunidade de avançar em mais uma etapa no meu sonho profissional.

A todos os envolvidos direta e indiretamente com o sucesso dessa minha empreitada os meus mais sinceros “Muito Obrigada”.

Grandes são as obras do Senhor, dignas de estudo para quem as ama.
Salmos 111: 2

RESUMO

SILVA, Carenn Rodrigues e Almeida. Extrato de *Punica granatum* L. (romã): análise das propriedades para uso como sanitizante no manejo da ordenha bovina. 2024. 13 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

As normas previstas por legislação vigente para a produção agropecuária adequam os sistemas de produção a fim de garantir a segurança e qualidade do alimento, o que abarca os aspectos higiênico-sanitários e boas práticas de produção por parte dos cuidadores das vacas, ordenhadores e manipuladores do leite. A mastite bovina é um desafio importante visto os agentes infecciosos frequentemente isolados de casos de mastite que se mostram resistentes a antibióticos dificultando a sua erradicação. O uso de desinfetantes e antibióticos convencionais vem enfrentando a resistência bacteriana, o que leva a busca por alternativas como as fitosubstâncias e seus derivados. Portanto, o objetivo desse trabalho é comparar o efeito do extrato etanólico de cascas dos frutos de *Punica granatum* L., romã, com desinfetantes comerciais frente as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A análise fitoquímica do extrato foi feita por espectrometria de massa. A integridade de membrana foi analisada pela impregnação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo pelo parâmetro de intensidade de fluorescência (FL3) e pela quantificação do DNA no sobrenadante pelo kit FastDNA spin for soil typical workflow. A análise da superfície e ultraestrutura bacteriana foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). A análise fitoquímica do extrato indicou punicalagina como substância majoritária. Os resultados mostraram uma ação do extrato de *P. granatum* na alteração da integridade de membrana observado pela incorporação de iodeto de propídeo após tratamento com 50 mg/mL, 25 mg/mL e 10mg/mL do extrato em apenas 30 segundos para as duas cepas testadas. Os resultados da liberação de DNA no sobrenadante corroboraram os resultados da alteração na integridade de membrana e do extravasamento do conteúdo intracelular. As alterações nas superfícies ficaram evidentes nas imagens de MEV e MET, no qual é possível observar ruptura de membrana e extravasamento do conteúdo intracelular. A comparação do efeito do extrato com desinfetantes comerciais tradicionalmente usados (hipoclorito e clorexidina) realizadas pela macrodiluição em caldo e a determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro corroboraram o caráter promissor do extrato hidroalcoólico de casca de *P. granatum* visto sua eficácia contra as cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (*E. coli* e *S. aureus*, respectivamente) associadas à mastite bovina.

Palavras-chave: *Punica granatum*. Mastite bovina. Desinfetantes. Pré e Pós dipping.

ABSTRACT

SILVA, Carenn Rodrigues e Almeida. *Punica granatum* L. (pomegranate) extract: analysis of properties for use as a sanitizer in the management of cow milking. 2024. 139 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024**.**

The standards provided for by current legislation for agricultural production adapt production systems to ensure food safety and quality, which encompasses hygienic-sanitary aspects and good production practices on the part of cow caretakers, milkers and animal handlers. Bovine mastitis is an important challenge as infectious agents often isolated from cases of mastitis are resistant to antibiotics, making their eradication difficult. The use of conventional disinfectants and antibiotics has faced bacterial resistance, which leads to the search for alternatives such as phytosubstances and their derivatives. Therefore, the objective of this work is to compare the effect of the ethanolic extract of peels from the fruits of *Punica granatum* L., pomegranate, with commercial disinfectants against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The phytochemical analysis of the extract was carried out using mass spectrometry. Membrane integrity was analyzed by propidium iodide impregnation by flow cytometry using the fluorescence intensity parameter (FL3) and by quantification of DNA in the supernatant using the FastDNA spin for soil typical workflow kit. Analysis of the bacterial surface and ultrastructure was performed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Phytochemical analysis of the extract indicated punicalagin as the majority substance. The results showed an action of the *P. granatum* extract in altering the membrane integrity observed by the incorporation of propidium iodide after treatment with 50 mg/mL, 25 mg/mL and 10mg/mL of the extract in just 30 seconds for both strains tested. The results of DNA release into the supernatant corroborated the results of changes in membrane integrity and extravasation of intracellular content. The changes on the surfaces were evident in the SEM and TEM images, in which it is possible to observe membrane rupture and extravasation of intracellular contents. Comparison of the effect of the extract with traditionally used commercial disinfectants (hypochlorite and chlorhexidine) carried out by macrodilution in broth and the determination of colony forming units per milliliter corroborated the promising nature of the hydroalcoholic extract of *P. granatum* bark, given its effectiveness against the strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria (*E. coli* and *S. aureus*, respectively) associated with bovine mastitis.

Keywords: *Punica granatum*. Bovine mastitis. Disinfectants. Pre- and Post-dipping

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema do processamento do leite bovino 15
Figura 2- Esquema de Boas Práticas Agropecuárias / Sanitárias. 17
Figura 3- Tipos de mastite: contagiosa ou ambiental. 20
Figura 4- Ordenha de vacas leiteiras em que animais sadios são ordenhados à frente, seguidos pelos com mastite subclínica e por último os com mastite clínica, em galões separados para descarte adequado do leite impróprio. 21
Figura 5- Teste de Caneca de fundo escuro 22
Figura 6- California Mastitis Test (CMT) positivo pelo aspecto geliforme do leite. 23
Figura 7- Anatomia do Úbere 24
Figura 8- Staphylococcus aureus. 25
Figura 9- Escherichia coli 32
Figura 10- Formação de biofilme bacteriano. 37
Figura 11- Funções do Quorum Sensing (QS) e sua relação com biofilme bacteriano 38
Figura 12- Farmacocinética e farmacodinâmica. 43
Figura 13- Mecanismo de ação das classes de antimicrobianos. 43
Figura 14- Efeito da punicalagina sobre células de S. aureus em 4 horas de tratamento. 56
Figura 15- - Efeito da punicalagina no período de 10 horas sobre S. aureus. 57
Figura 16- Estrutura química da punicalagina, tanino hidrolisável encontrado no extrato hidroalcoólico de casca de romã. 65
Figura 17- Sobreposição das medianas de intensidade de fluorescência (FL3) após a incorporação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo após tratamento das suspensões de E. coli (A) e S.aureus (B) com as diferentes concentrações de extrato de P. granatum. 67
Figura 18- Concentração de DNA (ng/mL) nas culturas bacterianas tratadas com extrato etanólico 68
Figura 19- Microscopia Eletrônica de Varreduda de E. coli depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml 69
Figura 20- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de S. aureus depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml 70
Figura 21- Microscopia Eletrônica de Transmissão das suspensões de E. coli depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml 71
Figura 22- Microscopia Eletrônica de Transmissão das suspensões de S.aureus depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml 71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Produção de leite bovino por região/ estado brasileiros 13
Quadro 2- Produção mundial do leite, em litros (L), referente ao período de 2018 a 2022 ... 14
Quadro 3- Constituintes do biofilme bacteriano 37
Quadro 4- Desinfetantes comumente usados no manejo de vacas leiteiras 41
Quadro 5- Alternativas para antibióticos convencionais. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise da alteração da permeabilidade de membrana pela incorporação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo após tratamento das suspensões de E. coli com o extrato de P. granatum. 66
Tabela 2- Alteração da permeabilidade de membrana de pela incorporação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo após tratamento das suspensões de S.aureus com o extrato de P. granatum. 66
Tabela 3- Determinação das Unidades Formadoras de Colônias /mL (UFC/mL) das suspensões de S.aureus e E.coli após tratamento com diferentes concentrações de extrato de P. granatum e desinfetantes. 72

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	**REVISÃO DE LITERATURA**	12
1.1	**Produção leiteira no Brasil e Mastite Bovina**	12
1.2	**Caracterização da Mastite Bovina**	19
1.3	**Diagnóstico da Mastite**	21
1.4	**Microrganismos mais frequentes**	23
1.4.1	*Staphylococcus aureus*	25
1.4.1.2	Mecanismos de resistência a antimicrobianos de *S. aureus*	28
1.4.2	*Escherichia coli*	31
1.4.2.1	Mecanismos de resistência a antimicrobianos de *E. coli*	34
1.4.3	**A Formação de biofilme e a Mastite Bovina**	36
1.5	**Procedimento de desinfecção e tratamento convencional**	39
1.5.1	**Utilização de desinfetantes pré e pós- *dipping***	39
1.5.2	**Tratamento convenciononal com anti-inflamatórios**	42
1.5.3	**Tratamento convencional com o uso de antibióticos**	42
1.6	**Produtos naturais e a Medicina veterinária**	48
1.6.1	**Produtos naturais no tratamento de Mastite Bovina**	48
1.6.2	***Punica granatum* L. no tratamento de Mastite Bovina**	54
2	**OBJETIVOS**	59
2.1	**Objetivo geral**	59
2.2	**Objetivos específicos**	59
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	60
3.1	**Amostras bacterianas**	60
3.2	**Preparo das suspensões bacterianas**	60
3.3	**Preparo das suspensões de *Punica granatum***	61
3.4	**Análise fitoquímica do extrato de *P. granatum***	62
3.5	**Estudo *in vitro* da alteração da integridade das membranas por citometria de fluxo**	62

3.6	**Quantificação do DNA no sobrenadante das culturas das cepas bacterianas após o tratamento com o extrato de *P. granatum***	63
3.7	**Avaliação das alterações morfológicas das cepas bacterianas após tratamento de *P. granatum***	63
3.8.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	64
3.8.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	64
3.9	**Determinação da sobrevida bacteriana após tratamento com as diferentes concentrações de extrato e desinfetantes.**	65
4	**RESULTADOS**	65
4.1	**Análise Fitoquímica do Extrato Hidroalcoólico de *P. granatum.***	67
4.2	**Estudo *in vitro* da viabilidade de cepas bacterianas (*E. coli* e *S.aureus*) tratadas com extrato de *P. granatum* por citometria de fluxo.**	68
4.3	**Quantificação do DNA no sobrenadante das cepas bacterianas após o tratamento com o extrato de *P. granatum*.**	72
4.4	**Avaliação das alterações celulares ultraestruturais das cepas *E.coli* e *S.aureus* por MEV e MET.**	73
4.5	**Determinação da sobrevida bacteriana após tratamento com extrato e desinfetantes**	73
5	**DISCUSSÃO**	74
	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE- Natural sanitizers pre- and post-milking in the prevention of bovine mastitis	120

INTRODUÇÃO

A relevância do leite bovino produzido no Brasil muito se deve a seu desempenho internacional e sua expressiva lucratividade para o agronegócio nacional. Além do seu destaque nas classificações mundiais tanto de produção quanto de consumo e o valor agregado ao leite bovino e todos os seus derivados (MAPBIOMAS, 2020; IBGE, 2020; ANUALPEC, 2022; SILVA *et al*. 2023). Os estados das Regiões Sudeste e Sul do Brasil junto ao Estado de Goiás somam os maiores produtores de leite do Brasil, por propriedade, por volume variedade, contribuem para produção que atende as demandas internas e para exportação (MILKPOINT, 2024)

Além das questões econômicas, o leite bovino também é bastante relevante por seus aspectos sociais, culturais e nutritivos para população brasileira. O consumo é realizado em quantidades expressivas como produto e matéria-prima para pratos e sobremesas que agregam valor simbólico e afetivo, e por sua apreciação ao redor do mundo, refletido na importação e consumo do leite bovino, queijos, iogurtes e demais derivados (DE QUEIROZ *et al.,* 2021).

Assim, considerando o valor agregado ao leite bovino, todo o sistema de produção e processamento da indústria leiteira deve seguir rigorosas normas previstas e regulamentadas pela legislação brasileira referente a leite e derivados como as Instruções Normativas nº 76 e nº 77/2018 alteradas em 2019 -, a fim de se obter um leite da melhor qualidade nos aspectos comerciais, nutricionais e sanitários. As normas e leis visam à adequação das propriedades leiteiras ao regimento promotor de boas práticas agropecuárias, de produção de alimentos e da probidade sanitária para assegurar tanto a qualidade quanto a boa aceitação, segurança e legitimidade do leite a ser processado, comercializado e consumido (MÜLLER & REMPEL, 2021; DE QUEIROZ *et al*., 2021, MAPA, 2024).

E dentro desse contexto de garantia da qualidade e sanidade do leite, a mastite bovina é um dos desafios considerando o contexto higiênico-sanitário de boas práticas no manejo de vacas leiteiras, devido a diversos fatores que geram prejuízos e refletem limitações como a falta de padronização dos métodos de manejo (NADER *et al*., 2018). Prevenir, tratar e erradicar casos de mastite em rebanhos leiteiros têm se mostrado um desafio crescente. A mastite é uma infecção em grande maioria causada por bactérias, e entre os agentes causadores mais frequentemente isolados em casos

de mastite, que pode ser contagiosa ou ambiental, encontram-se *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (SÁ *et al*., 2018; SANTOS, 2019).

Outro fator relevante associado aos problemas causados pela infecção desses microrganismos relacionados à colonização e persistência no ambiente é a formação de biofilmes bacterianos que se mostram cada vez mais desafiadores para a indústria de alimentos de origem animal (MAURICE, BEDIE, SADIKOT, 2018).

Os procedimentos de criação do gado leiteiro se utilizam de desinfetantes para higienização dos equipamentos de ordenha e das tetas das vacas leiteiras antes e depois das ordenhas a fim de prevenir a transmissão de patógenos entre as vacas e mitigar possíveis biofilmes presentes da superfície das tetas e dos equipamentos. Nos casos clínicos de mastite são administrados anti-inflamatórios e para erradicar os patógenos causadores de mastite tanto clínica quanto subclínica são administrados antibióticos veterinários cujo uso massivo têm gerado maior resistência por parte das bactérias (KAYITSING *et al*., 2017; BACH *et al*., 2019; CHENG & HAN, 2020).

A resistência bacteriana é um dos fatores limitantes mais urgentes dentro do panorama das mastites bovinas (PASCU *et al*., 2022). Assim, a busca por alternativas para prevenção e tratamento de mastites, aumentou o número de pesquisas por plantas com propriedades farmacológicas e produtos naturais com potencial de aplicação na medicina veterinária, mostrando resultados promissores e efetivos (NADER *et al*., 2018; CURCIO, 2022).

Punica granatum L., popularmente conhecida como romã, tem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias contra bactérias isoladas de casos de mastite e seus biofilmes, inclusive em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (FREITAS *et al*., 2020). Alguns trabalhos demonstraram que *P. granatum* apresenta propriedades bactericidas podendo ser utilizada como um agente antisséptico (DOS SANTOS; SANTOS, 2019; MARTINS & CASALI, 2019; CAMPOS *et al.*, 2021). Esses achados nos levaram a comparar as propriedades bactericidas do extrato etanólico de *P. granatum* com desinfetantes comerciais usados contra bactérias relacionadas com mastite bovina

1 **REVISÃO DE LITERATURA**

1.1 **Produção Leiteira no Brasil e Mastite Bovina**

O Brasil tem protagonismo no ranking de produção mundial, sendo um dos três maiores produtores de leite com volumes superiores a 34 milhões de litros/ano com importante papel desempenhado por pequenas e médias propriedades e cerca de 218 milhões de bovinos (Quadro 1). A produção leiteira é uma das mais praticadas atividades econômicas do país, difundida por todo território e onde fatores como solo, sol, água, tecnologia e capacitação dos produtores proporcionam tamanho destaque entre os fornecedores mundiais mais relevantes (WERNECKE *et al*., 2016; MAPBIOMAS, 2020; IBGE, 2020; DE QUEIROZ, 2021; ANUALPEC, 2022; SILVA, 2023; EMBRAPA, 2023).

Quadro 1- Produção de leite bovino por região/ estado brasileiros

Brasil e UF	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Região Norte (Rondônia e Pará)	1.091.490 L	1.126.978 L	1.049.343 L	1.018.353 L	1.012.630 L	964.928 L	743.110 L
Região Nordeste (Ceará, Pernambuco, Sergipe e Bahia)	1.173.348 L	1.250.228 L	1.406.582 L	1.554.246 L	1.718.041 L	1.791.866 L	1.575.830 L
Região Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo)	9.477.376 L	9.716.754 L	9.634.543 L	9.842.681 L	10.025.000 L	9.473.176 L	8.786.894 L
Região Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina)	8.431.814 L	9.118.698 L	9.103.724 L	9.323.928 L	9.746.231 L	9.805.756 L	9.533.445 L
Região Centro Oeste (Mato Grosso e Goiás)	2.994.605 L	3.120.853 L	3.163.670 L	3.266.442 L	3.130.015 L	2.992.073 L	2.534.1047 L
Brasil	23.169.654 L	24.333.511 L	24.457.864 L	25.011.824 L	25.032.169 L	24.989.331 L	23.173.3831 L

Fonte: Adaptado de IBGE, 2021; Conab, 2023; EMBRAPA,2023.

Considerando a inserção do Brasil no cenário mundial (Quadro 2), a produção nacional está sob constante e forte concorrência nos aspectos de qualidade, quantidade, produtividade e custos de produção, e em 2018 os estados brasileiros de maior produção de leite bovino foram Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul respectivamente (FAOSTAT, 2018; IBGE, 2018). Além do aspecto econômico, a produção de leite no Brasil tem elevado caráter social e político, e o crescente aumento da produção de leite no país se deve em parte ao aumento da produtividade do rebanho leiteiro em litros/anos. A cadeia produtiva do leite bovino é geradora de empregos, renda e tributos, e por esses motivos a bovinocultura leiteira sustenta um vínculo entre o desenvolvimento do setor primário e o estabelecimento

socioeconômico (SIMÕES, OLIVEIRA, LIMA-FILHO; 2015; CEPA/EPAGRI, 2014/2015; 2017/2018; KEMER*et al.*, 2020).

Quadro 2- Produção mundial do leite, em litros (L), referente ao período de 2018 a 2022

País/ Bloco Econômico	**2018**	**2019**	**2020**	**2021**	**2022**	**Participação em 2022**
Argentina	10.837 L	10.640 L	11.445 L	11.900 L	12.100 L	2,2%
Brasil	23.745 L	24.262 L	24.965 L	24.845 L	25.095 L	4,6%
China	30.750 L	32.012 L	34.400 L	34.600 L	35.500 L	6,5%
União Européia	142.258 L	143.060 L	145.415 L	145.700 L	146.700 L	26,7%
Índia	89.800 L	92.000 L	93.800 L	96.000 L	98.000 L	17,8%
México	12.368 L	12.650 L	12.750 L	12.850 L	12.980 L	2,4%
Nova Zelândia	22.017 L	21.896 L	21.980 L	22.240 L	22.250 L	4,1%
Rússia	30.398 L	31.154 L	32.010 L	32.020 L	32.150 L	5,9%
Reino Unido	15.189 L	15.429 L	15.447 L	15.500 L	15.600 L	2,8%
Estados Unidos	98.688 L	99.084 L	101.252 L	102.604 L	103.284 L	18,8%
Outros	46.541 L	45.551 L	46.137 L	45.813 L	45.697 L	8,3%
Mundo	522.591 L	527.738 L	539.601 L	544.072 L	549.356 L	100%

Fonte: Adaptado de IBGE e Conab, 2022.

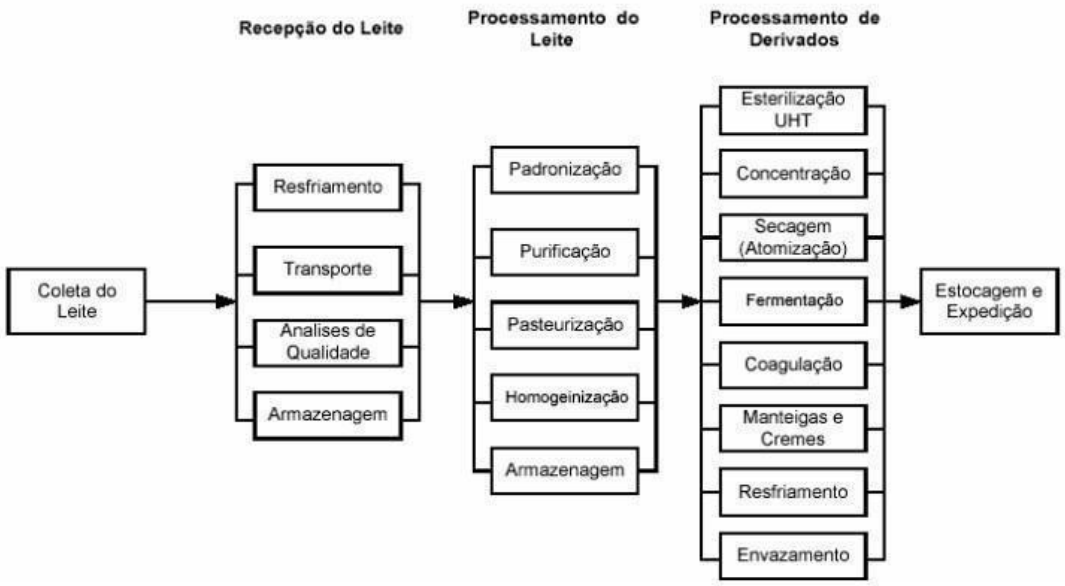
Para além de seus aspectos financeiros, o leite bovino é de insubstituível importância no contexto de suprimento alimentar por ser considerado um dos mais completos alimentos e de alto valor nutritivo relevante em todas as fases da vida. No contexto atual o leite bovino e seus derivados possuem as principais fontes de proteína e cálcio na dieta da população brasileira, e mais ainda entre os pertencentes das classes sociais de baixa renda (MATTER *et al*., 2017; JAMAS *et al.,*2018; DE QUEIROZ *et al*., 2021).

Considerando a histórica participação da pecuária leiteira na organização política, econômica e social nacional, é fundamental incluir neste contexto as dificuldades experienciadas pelos produtores leiteiros e que por vezes acarretam

entraves para a incrementação de melhoramentos nos sistemas de produção leiteira utilizados. Embora diante das limitações das políticas públicas e da pouca abrangência das ações de capital privado, a evolução ocorrida na pecuária leiteira ao longo das décadas é evidenciada pelas pesquisas científicas, pela implementação de equipamentos de maior resolução e pelo aprimoramento das técnicas conferindo assim a cada vez superior qualidade do leite e, por conseguinte, gradativo aumento de sua exportação (SOUTO, 2016; SOUTO & FOLMER, 2020; DE QUEIROZ *et al.,* 2021).

Martins *et al*. (2013) argumentaram que a qualidade do leite se deve a um somatório de fatores como manejo, alimentação, coleta e armazenamento do leite, sanidade e potencial genético dos rebanhos, e ainda, descontaminação das vacas, dos equipamentos de ordenha e dos manipuladores. Tais aspectos são englobados pelas Boas Práticas Agropecuárias (BPA), que dizem respeito à produção, ao processamento, armazenamento, transporte e a distribuição de produtos agroalimentares até que os mesmos cheguem aos consumidores, de modo a assegurar garantia da qualidade e segurança do leite agregando valor ao sistema de produção (Figura 1). Legislações, normas sanitárias, a quantidade de produtores envolvidos, o nível de tecnificação e o mercado consumidor também são fatores de influência direta na produção do leite. (MÜLLER & REMPEL, 2021; DE QUEIROZ *et al*., 2021).

Figura 1- Esquema do processamento do leite bovino

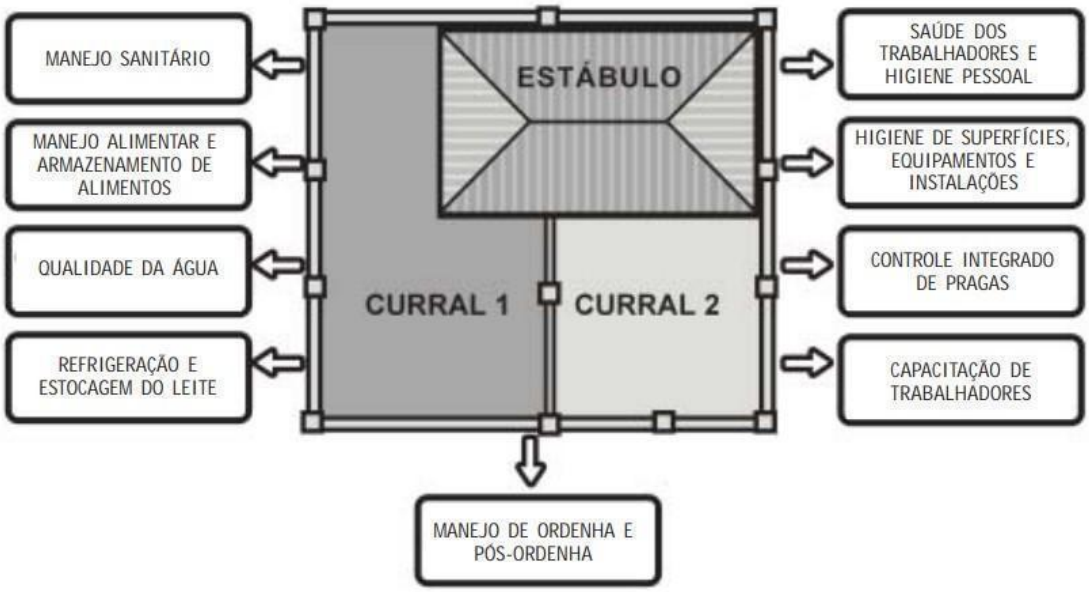


. Fonte: Apostila do Curso Técnico em Agroindústria da Universidade Estadual do Ceará.

O leite de qualidade é obtido conforme as exigências previstas pela legislação do leite e de laticínios, e para seu cumprimento, nas propriedades leiteiras deve haver monitoramento e controle da mastite em seus rebanhos, para promoção tanto do bem-estar animal quanto dos ganhos econômicos esperados ao produtor. A produtividade animal é determinante para o comércio do leite e seus derivados, de maneira que os impactos causados pela mastite têm efeito inversamente proporcional para o sistema de produção (NEIVA, 2018; SHARUN *et al*., 2021).

Boas práticas sanitárias de manejo (Figura 2), quando conduzidas com excelência, previnem problemas em um contexto geral, além de mastite e inclusive podem substituir a antibioticoterapia na diminuição de incidência das infecções, sendo por isso, indispensáveis. Considerando a qualidade total do leite a ser comercializado, as propriedades leiteiras deveriam adotar medidas de prevenção e controle de mastite. Entre as medidas de prevenção estão às medidas múltiplas como a realização de diagnósticos regulares, investigação de fatores predisponentes e identificação de agentes etiológicos considerando as particularidades de cada propriedade. Essas medidas quando implementadas contribuem para eficiência do manejo e otimização da prevenção de infecções iniciais, recidivas e coinfecções (SHARUN *et al*., 2021; SILVA, 2023).

Figura 2- Esquema de Boas Práticas Agropecuárias / Sanitárias.



Fonte: Apostila do Curso Técnico em Agropecuária da Universidade Estadual do Ceará

O Programa dos “Cinco Pontos no Controle de Mastite Bovina”, desenvolvido pelos pesquisadores do National Institute of Research in Dairying (NIRD) na Inglaterra, indica os pontos de maior atenção para o controle de mastite contagiosa dentro das propriedades leiteiras:

1. Rotina de ordenha correta com desinfecção das tetas (pré e pós- *dipping*);
2. Tratamento dos animais diagnosticados com mastite clínica no período de lactação;
3. Limpeza, manutenção e bom funcionamento dos equipamentos utilizados para a ordenha;
4. Identificação, separação e descarte de vacas com diagnóstico de mastite crônica;
5. Manejo ambiental com devida assepsia do local de ordenha.

Este programa foi melhorado, tornando-se base para um “Programa de 10 pontos” recomendado pelo National Mastitis Council, dos Estados Unidos. A diferença da nova versão de 10 pontos para a anterior de 5 pontos são os pontos:

6. Inclusão de rotina de análises de sanidade do úbere;
7. Estabelecimento de metas para os indicadores de sanidade total das vacas;
8. Rotinas de manutenção e de uso adequado dos equipamentos de ordenha;

9. Tratamento da mastite clínica quando recomendado;
10. Implantação de medidas de biossegurança e avaliação periódica das medidas de controle (HILLERTON *et al.*, 2018; SANTOS et al., 2019).

Ainda sobre medidas de controle, Müller (2002) em seu trabalho aponta que a vacinação pode ser usada tanto para controle quanto para profilaxia em casos de mastite ambiental, auxiliando na redução de manifestações clínicas, e essas vacinas podem ser desenvolvidas a partir de patógenos isolados de surtos em propriedades leiteiras em que as vacas novilhas seriam vacinadas no período seco (entre 30 e 60 dias antes do parto) com dose de reforço após seis meses. É uma abordagem de caráter preventivo que corrobora com o levantamento de Mesquita*et al.* (2019) que demonstraram a antibioticoterapia como abordagem resolutiva de casos de mastite, pode não ser uma opção unânime entre as propriedades leiteiras ao se considerar os gastos com os medicamentos e o descarte do leite com resíduos, de modo que o reforço de medidas de controle, prevenção e detecção precoce se tornam opções mais lucrativas e efetivas para tais propriedades.

Os argumentos defendendo maior esforço por parte dos produtores de leite na eficácia do controle de mastite é enfatizado mais uma vez ao se observar os trabalhos de Da Silva (2020), Bettanin *et al.*(2019) e Oliveira *et al.* (2013) que apresentaram diferentes prevalências de patógenos causadores de mastite clínica em propriedades cuja condução de mecanismos de controle e prevenção eram diferentes entre si e por isso, apresentando diferentes resultados. Esses resultados evidenciam as diferenças nos recursos financeiros e processos de produção leiteira em diferentes regiões do Brasil (Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro).

Nesse contexto, as perdas econômicas diretas pela mastite são múltiplas e de grande repercussão, sendo alguns exemplos, os custos do tratamento das vacas, descarte do leite e infecções recidivas. As indiretas incluem a redução da produção de leite e de sua qualidade, antecipação da secagem, abate do animal e problemas de saúde relacionados à mastite (DA FONSECA *et al*., 2020; SILVA *et al.*, 2022). O período de tratamento das vacas leiteiras com mastite é um dos causadores dos prejuízos envolvendo a comercialização do leite. Além disso, temos as perdas econômicas diretas por mastite, um problema adicional é a alteração das características do leite por causa dos medicamentos e antibióticos, alterações essas que se refletem nos componentes químicos, na microbiota, no aumento de células

somáticas e ainda riscos à saúde pública pela possível disseminação de patógenos zoonóticos (ARCANJO *et al*., 2017; FONSECA *et al*., 2021).

1.2 **Caracterização da Mastite Bovina**

A mastite consiste em inflamação da glândula mamária, e por ser doença incidente em rebanho leiteiro, tem um grande impacto na produção leiteira, devido à frequência com que acontece (LANGONI *et al.,* 2011; NADER *et al*., 2018). O processo inflamatório desencadeado pela mastite é causado por microrganismos que penetram o úbere pelo orifício do canal, infectam e colonizam os tetos, com posterior lesões no epitélio glandular. As bactérias estão frequentemente associadas à mastite com frequência em 85% dos casos com cerca de 90 espécies descritas relacionadas à mastite. Outros microrganismos estão relacionados com a mastite bovina, como fungos, leveduras e, raramente, mas possível, vírus (ZHYLKAIDAR *et al*., 2021).

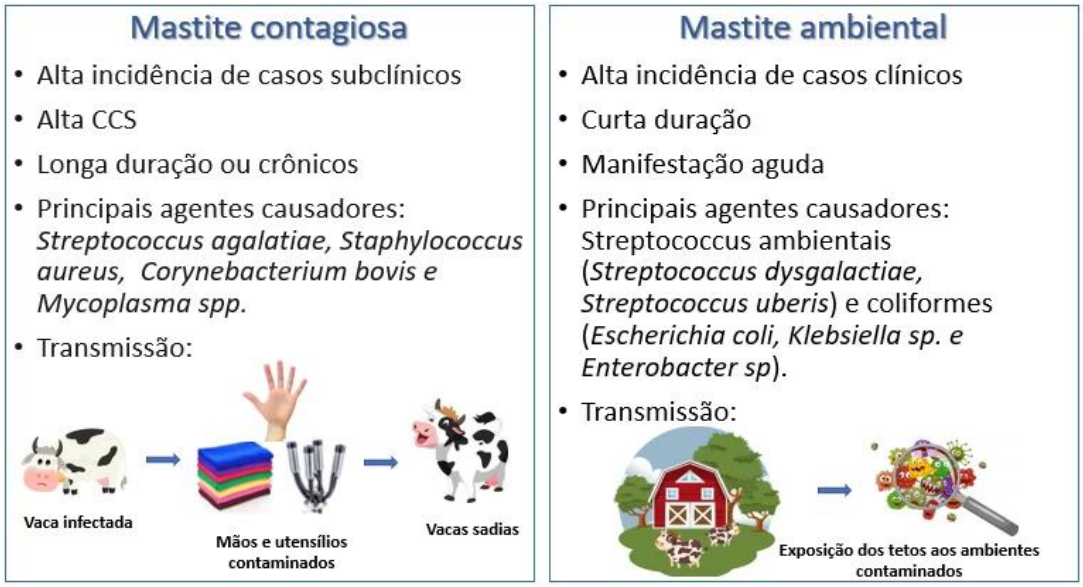
Pode ocorrer tanto de forma clínica (com os sinais clássicos de inflamação e suas complicações com alterações visíveis no leite), como de forma subclínica (assintomática e sem alterações no leite) (MENEZES *etal*., 2014; MPATSWENUMUGABO *et al*., 2017).

A mastite pode ser, além de clínica ou subclínica, contagiosa ou ambiental (Figura 3). A mastite contagiosa recebe esta denominação por ser causada por microrganismos contagiosos geralmente relacionados à mastite subclínica (que pode progredir ao ponto de se tornar mastite crônica). Nesses casos os ordenhadores disseminam esses microrganismos entre o rebanho leiteiro por meio das mãos e dos equipamentos de ordenha. Exemplos de microrganismos associados à mastite contagiosa são *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Staphylococcus aureus* (CRUZ, RIBEIRO, BARRETO, 2022).

A mastite ambiental é assim chamada por se relacionar a microrganismos encontrados em praticamente todos os ambientes (água, solo, fezes, pele, úbere do animal entre outros) e se relacionam com a mastite clínica. Patógenos ambientais oportunistas, que forem aptos a sobreviver na glândula mamária do hospedeiro causam infecções bem-sucedidas que refletem em alterações no leite (como pus, grumos e sangue), podendo ou não também apresentar sintomas como inchaço, vermelhidão, ou aumento da sensibilidade ao toque no úbere. Exemplos de

microrganismos associados à mastite ambiental são *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa* (CRUZ, RIBEIRO, BARRETO, 2022).

Figura 3- Tipos de mastite: contagiosa ou ambiental.



Fonte: https://blog.prodap.com.br/mastite-clinica-o-que-e-causas-como-tratar-e-principais-indicadores/

Lopes *et al.* (2012) afirma que 15% de rebanho com mastite resulta em cerca de 60% da perda do leite (Figura 4). A infecção animal é um grande contaminador do leite e seus derivados, podendo causar contágio no rebanho e possíveis intoxicações alimentares, e portanto, não deve ser negligenciada e nesse sentido, um programa de monitoramento de mastite evita a disseminação de patógenos entre animais e humanos, equipamentos e produtos (LUCHEIS, 2012). Macedo (2005) relata que a qualidade do leite e produtos lácteos revela a saúde das glândulas mamárias do animal bem como outras condições de saúde e aspectos gerais da produção leiteira como manejo, por exemplo. A proliferação de microrganismos e consequente infecção causada por eles se devem a fatores como condições sanitárias do rebanho, procedimentos higiênicos, potabilidade da água, higiene das instalações e outros (REIS *et al*., 2013). E ainda nesse contexto, temos os fatores socioeconômicos associados à mastite, que ultrapassam os prejuízos financeiros dos criadores de gado leiteiro e produtores de leite. Abrange também questões de saúde animal e humana haja vista a possibilidade de transmissão zoonótica de patógenos pelo leite de vacas com quadro mastítico e contaminação de diversos ambientes através do percurso do

leite até o consumidor, de modo que a mastite tem relevância no contexto de intoxicações alimentares em decorrência da ingestão de microrganismos e de suas toxinas presentes no leite e/ou em seus derivados. (FETSCH & JOHLER, 2018).

Figura 4- Ordenha de vacas leiteiras em que animais sadios são ordenhados à frente, seguidos pelos com mastite subclínica e por último os com mastite clínica, em galões separados para descarte adequado do leite impróprio.

Fonte: Margatho *et al*; 2016.

1.3 **Diagnóstico de mastite**

A detecção de mastite clínica é feita por meio de observação dos sintomas e manifestações no úbere da vaca, exames do leite (que costuma apresentar alterações) e antibiograma. O teste de caneca de fundo preto (Figura 5) é realizado antes da ordenha para analisar o aspecto dos primeiros jatos de leite sob o contraste do fundo preto da caneca, e assim identificar alterações mais visíveis e drásticas; e de maneira simples e objetiva permite a observação da perda de características inerentes à integridade do leite bem como um panorama sobre o estado de acometimento dos tetos pela infecção e gravidade dos sintomas (BELOTI, 2015; MAIOCHI, 2019).

Figura 5- Teste de Caneca de fundo escuro

Fonte: Margatho *et al*; 2016.

A detecção de mastite subclínica é feita por meio de exames microbiológicos com a finalidade de identificar agentes etiológicos nos rebanhos e determinar seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (por meio de testes morfotintoriais, bioquímicos e antibiograma). A Contagem de Células Somáticas (CCS) é a forma mais barata e rápida de averiguar uma possível mastite subclínica. Ainda temos o California Mastitis Test (CMT- Figura 6), um teste que consiste na reação do leite, recém-ordenhado ou no ato da ordenha, com um detergente contendo um reagente que proporciona a precipitação de leucócitos e a contagem estimativa das células somáticas presentes nas amostras de leite testadas. Quanto maior o número de leucócitos com o reagente, maior a gelificação da amostra de leite e, por conseguinte, maior é o quadro infeccioso em desenvolvimento porém sem manifestação de sintomas (BELOTI, 2015; MAIOCHI, 2019; FONSECA *et al*., 2021; SHARUN *et al.,* 2021).

Avanços em proteômica permitem a identificação de biomarcadores (como proteínas, prostaglandina sintase D, entre outros) que poderiam ser detectados e quantificados por métodos de rotina como o ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay). Considerando a relevância da detecção da mastite com maior rapidez para evitar as perdas dos produtores, se faz necessário investimento para o incentivo a pesquisa de novos testes diagnósticos (VIGUIER *et al*., 2009).

Figura 6- California Mastitis Test (CMT) positivo pelo aspecto geliforme do leite.

Fonte: Beloti, 2015

Existem ainda outros métodos de detectar mastite como os indicadores de pH, teste de condutividade elétrica, teste de atividade de N-acetil-beta-D-glucosaminidase, teste de conteúdo de lactose, a avaliação de fluxo de leite e a quantificação de proteínas de fase aguda. (BELOTI, 2015; MAIOCHI, 2019; FONSECA *et al.,* 2021; SHARUN *et al.,* 2021).

1.4 **Microrganismos mais frequentes e seus fatores de virulência associados à mastite**

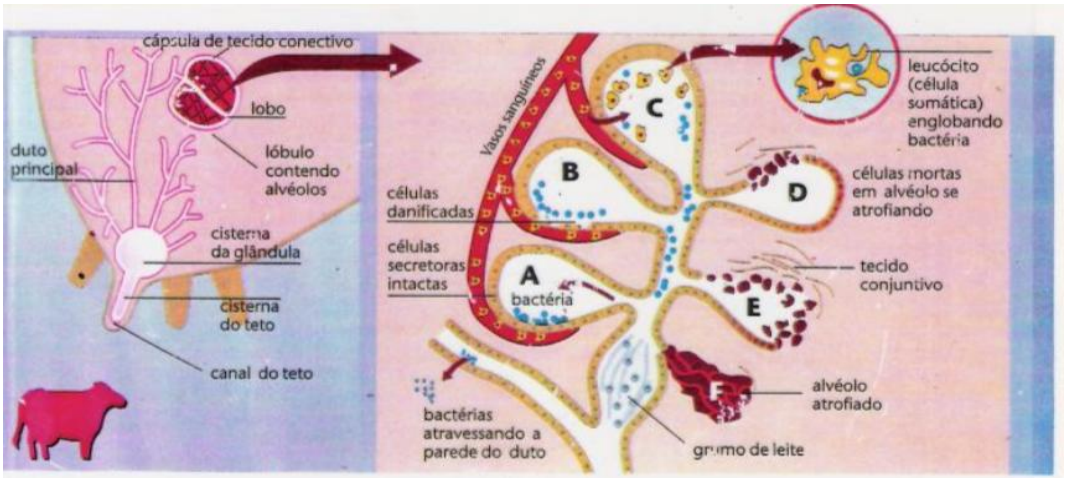
A comunidade microbiana tem relevância para as funções metabólicas e fisiológicas e para a homeostase do animal durante sua vida, sendo diversa e plural (ADDIS *et al*., 2016).

Os microrganismos que compõem a microbiota de cada indivíduo são distintos e dependem de seu estado geral de saúde, portanto, a saúde e a microbiota das glândulas mamárias são determinantes para o contexto da mastite, haja vista o úbere (parte inferior do interior da glândula) contém microrganismos, e alguns deles podem ser potencialmente causadores de doenças (FERNÁNDEZ *et al*., 2013; METZGER *et al*., 2018; CAMPOLINA *et al.,* 2019).

O úbere da vaca compreende quatro quartos em que cada um é uma glândula individual e independente, cujas estruturas funcionam separadas, drenada por uma

teta, sem que haja fluxo de leite entre os quartos (Figura 7). Os principais constituintes do leite são produzidos pelas células epiteliais glandulares do úbere (MAIOCHI, 2019).

Figura 7- Anatomia do Úbere



Fonte: https://docplayer.com.br/65606620-Tecnologia-de-leite-e-derivados.html

A presença de microrganismo no úbere em si, não necessariamente apresenta ameaça, e já se considerou que a microbiota presente no leite tinha origem de contaminação proveniente da pele da fêmea e/ou da cavidade oral da prole, porém hoje se considera que a glândula mamária e o úbere têm microbiota própria e complexa. Pesquisas demonstraram uma rota endógena, entero-mamária em que bactérias da microbiota intestinal são levadas até a glândula mamária por macrófagos e células dendríticas por meio do sangue ou da linfa durante a recirculação dos fagócitos, o que explicaria a rica variedade da microbiota mamária bovina (FERNANDÉZ, 2013).

Dentro da complexidade da microbiota mamárias bovinas encontram-se as espécies *Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus* e *Micrococcus* que são frequentemente isoladas do leite fresco (QUIGLEY *et al.,* 2013).

Cerca de 95% dos casos de mastite bovina, são causadas por bactérias, frequentemente associadas às espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae, S. dysgalactiae e S.uberis*), *Escherichia* spp. e coliformes (*E.coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sp*., *Klebsiella sp*.) e *Pseudomonas* spp. Os outros 5% das infecções são causadas por outros microrganismos (SÁ *et al*., 2018).

Bhatt*et al*. (2012) fez um estudo metagenômico com leite de animais com mastite subclínica em que 90% dos agentes etiológicos isolados eram bactérias, e dentro desta porcentagem as famílias mais prevalentes foram *Enterobacteriaceae*,

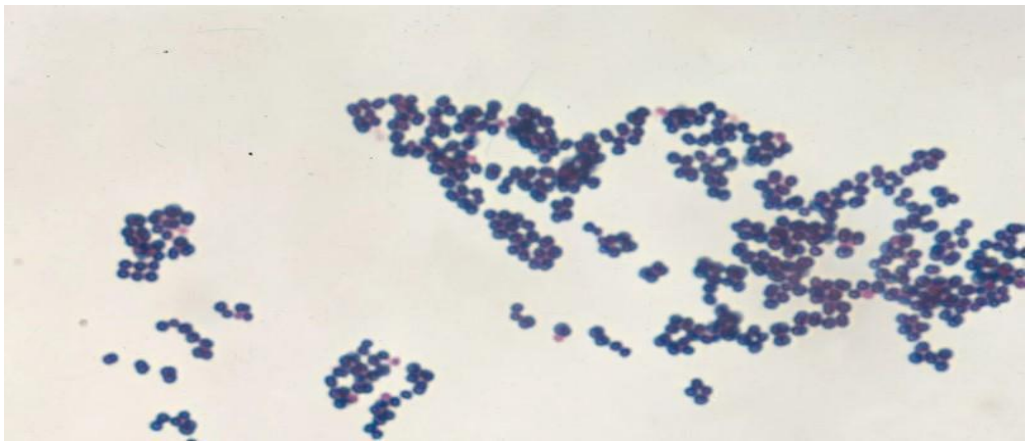
Staphylococcaceae, *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae* e *Bacillococcaceae*. Santos (2019) em seu trabalho considerou que alguns dos patógenos comumente encontrados em mastite tanto contagiosa quanto ambiental incluem Str*eptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovi*s, *Mycoplasma* spp. e *Enterococcus* spp., formando um perfil de microrganismos responsáveis pelos principais quadros mastísticos clínicos e subclínicos.

Staphylococcus aureus e *Escherichiacoli* são as espécies bacterianas frequentemente associadas à mastite contagiosa e ambiental, respectivamente.

1.4.1 ***Staphylococcus aureus***

As espécies que constituem o gênero *Staphylococcus* spp. possuem características morfotintoriais como cocos Gram-positivos (Figura 8), na maioria das vezes são imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, comensais e frequentemente associados a infecções, além de bons produtores de biofilme, e com destaque para os casos de mastite visto que representantes do gênero são prevalentes em infecções intra mamária de ruminantes. A mastite estafilocócica é uma das formas mais comuns de contaminação do leite bovino (TEBALDI *et al.*, 2008; VLIEGHER *et al*., 2012).

Figura 8- *Staphylococcus aureus.*



Fonte: Encyclopedia Britannica

A capacidade de adesão ao epitélio da glândula mamária é um ponto crítico nas infecções por espécimes desse gênero, levando a formação de biofilme, que lhes conferem proteção aos antimicrobianos e consequentemente a persistência das infecções intramamárias estafilocócicas em bovinos leiteiros. Um exemplo de como o

desenvolvimento do biofilme reduz o poder de penetração de substâncias antimicrobianas e de enzimas digestivas das células imunológicas do hospedeiro infectado é a matriz polissacarídica do biofilme produzida por *Staphylococcus aureus* que potencializa a permanência no epitélio mamário ao proteger a bactéria de fagocitose, e da ação de antimicrobianos e desinfetantes (OLIVEIRA, BORGES, SIMÕES, 2018).

A espécie bacteriana *S. aureus* é coagulase positiva, β-hemolítica, maltose positivo e manitol positivo. São formadoras de colônias pigmentadas comumente encontradas nas microbiotas oral, nasal e gastrointestinal. São os patógenos mais comuns associados a infecções de tecidos moles, intoxicações alimentares humanas e animais (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004; DE FREITAS GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Embora representantes de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, sejam comumente isolados de vacas com mastite, como *S. chromogenes, S. simulans, S. xylosus, S. epidermidis* segundo Hosseinzadeh & Saie (2014), o protagonismo de *S. aureus* se deve à sua notável capacidade de produção de enterotoxinas e a produção de biofilme, que são fatores de virulência, considerando o risco de enterotoxinas estafilocócicas e a toxina do choque tóxico serem veiculadas pelo leite (OTTO, 2008; TEBALDI *et al*., 2008; NADER *et al*., 2018).

Staphylococcus aureus é um dos principais causadores de mastite contagiosa com altíssima incidência em gado leiteiro em vários países do mundo, com alto potencial patogênico, com destaque na saúde animal e humana, sendo reconhecido mundialmente como patógeno responsável por cerca de um terço dos casos de mastite em bovinos (tanto clínica quanto subclínica). É uma ameaça à indústria pecuária e a criação de gado leiteiro por causa de sua acentuada patogenicidade e persistência no ambiente, do fácil contágio entre as vacas e da baixa resolução de infecção pelos tratamentos disponíveis. Infecções por *S. aureus* são ameaçadoras também pela frequente cronificação da infecção principalmente nos períodos de lactação e, por conseguinte, pelo alto custo de resolver os prejuízos resultantes (ISLAM *et al*., 2012; BROTEL *et al*., 2010; PETON & LE LOIR, 2014; RAINARD *et al*., 2018; PUMIPUNTU *et al*., 2019).

Santos (2019) confirmou a relevância dessa bactéria na medicina veterinária envolvendo a bovinocultura leiteira ao ressaltar que *S.aureus* é um patógeno de difícil controle e grande disseminação; controle este cada vez mais dificultado pela habilidade da espécie em desenvolver estratégias de evasão e resistência. Segundo

Cussolim*et al*.(2021), estudos sobre seu controle no gado leiteiro são cada vez mais necessários ainda mais se considerarmos a incidência de infecções por cepas multirresistentes (KEEFE, 2012; BOTARO *et al*., 2015; SANTOS, 2019).

O biofilme dessa espécie bacteriana tem formação multifatorial e lhes confere sobrevida em ambientes hostis por ser uma estratégia de sobrevivência ativada em situações de estresse (ex.: limitação de oxigênio e íons Fe, concentração de alguns antibióticos, entre outras); e sua formação permite que bactérias que vivem de maneira planctônica possam se organizar em comunidades e consórcios, sendo um importante fator nessa organização a enzima coagulase que converte fibrinogênio em fibrina, permitindo a estruturação do biofilme estafilocócico (GUILHEN *et al*., 2016, ZAPOTOCZNA, O'NEIL, O'GARA, 2016).

Fabres-Klein *et al*. (2015) alegaram que a associação de *S.aureus* à mastite bovina crônica refratária a ação da antibioticoterapia está relacionada à formação de biofilmes; e após a invasão do epitélio, *S. aureus* se utiliza de outros mecanismos de virulência, além da formação de biofilmes para permanecer nos tecidos, como inibição do sistema complemento, neutralização da fagocitose e inibição de resposta imunes celular e humoral.

Os fatores de virulência de *S. aureus* enquanto grandes responsáveis por sua adaptabilidade e remanescência são divididos em dois grandes grupos: 1) Proteínas de superfície; 2) Exoproteínas. O grupo das proteínas de superfície compreende moléculas como proteína A (SpA), proteínas ligantes de fibronectina (FnBP) e proteínas ligantes de fibrinogênio (FbBP). Enquanto o grupo das exoproteínas compreende moléculas como leucocidina de Panton Valentine (PVL), toxina de síndrome do choque (TSST-1) entre outras (OLIVEIRA, BORGES, SIMÕES, 2018). A proteína A (SpA) de *S. aureus* se liga ao receptor de citocinas TNP1, interleucinas IL-8 e à porção Fc de anticorpos, sendo possível assim neutralizar sua eliminação pela resposta imune e amplificar a resposta inflamatória (KARAUZUM & DATTA, 2017; POLLIT *et al*., 2018; TAM & TORRES, 2019; VLAEMINCK *et al*., 2020).

A parede celular de *S. aureus* contém moléculas como polissacarídeos e proteínas antigênicas como ácido teicóico, glicanopeptídeo, a proteína A, e adesinas (LUTZ *et al.*, 2003 apud SANTOS *et al*., 2007). A família de adesinas MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) é um fator de virulência adicional de S. *aureus* associado à adesão e invasão de células hospedeiras (KLEIN *et al.*, 2012).

Os mecanismos complexos e multifatoriais de expressão de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus,* tornam a espécime relevante, de grande notoriedade e digno de estudo e controle na mastite (ACOSTA *et al*., 2016; SILVA, C.R.A.S, 2020).

1.4.1.2 **Mecanismos de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus.***

Segundo Loureiro *et al*. (2016) ao longo do tempo as bactérias desenvolveram mecanismos para evitar a ação de agentes que possam eliminá-las ou interferir em seu metabolismo (principalmente antibióticos) e por consequência sua subsistência. Esses mecanismos de resistência são divididos em quatro grandes grupos: 1) destruição ou modificação de substância por via enzimática; 2) redução da permeabilidade de membrana ou sistema de efluxo; 3) modificações das moléculas alvo das substâncias antimicrobianas; 4) fabricação de moléculas alvo alternativas, resistente à ação inibitória do antibiótico.

Os mecanismos de resistência, formação de biofilme, produção de toxinas, exoproteínas e bombas de efluxo têm sua ação mediada pela expressão de genes de resistência, que podem ser intrínsecos (presente no genoma natural das bactérias) ou adquiridos (por meio dos mecanismos de aquisição e transferência de genes). (ZOUMPOPOULOU *et al*., 2017; JIANG *et al*., 2017; DE ANDRADE CALAÇA *et al.,* 2020).

Taglialegna *et al*. (2016) verificou que o gene *bap* de *S. aureus* tem sua expressão mediada pela presença de glicose, que faz com que promova a formação de arcabouço de matriz de biofilme em resposta a sinais ambientais.

O grupo das *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) é alvo de preocupação devido ao aumento da frequência do isolamento dessas cepas em amostras de leite bovino. Essa preocupação é reforçada pelo fato de que o uso indiscriminado de antibióticos é muito maior na medicina veterinária aplicada a atividades de criação animal que na medicina humana, aumentando a pressão seletiva, de maneira que a rapidez com que as cepas desenvolvem mecanismos de resistência seja um agravante (SANTOS & FONSECA, 2007; SANTOS, 2019). Ordonho (2021) em seu trabalho identificou *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* spp. em leite mastítico sendo que quatro cepas eram de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e duas cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistente a oxacilina (SCNRO).

Gonçalves (2021) avaliou cepas de *S. aureus isoladas* de vacas leiteiras com mastite por meio do Multilocus Sequence Typing (MLST) e por perfilação de susceptibilidade a antimicrobianos, em que os isolados apresentaram grande diversidade com considerável número de novos perfis alélicos ou tipo de sequência (Sequence Types-STs). Observou a proximidade genética entre *S. aureus* de origem animal e de origem humana além de alta resistência a penicilinas, tetraciclinas e isolados MRSA.

Craft *et al.* (2019) explicita o enorme potencial de *S. aureus* para resistir a antimicrobianos por conta da transferência horizontal de genes, que geralmente é feita pelos mecanismos de conjugação, transformação e transdução.

Os mecanismos de resistência bacterianos têm seu funcionamento mediado pela codificação de genes de resistência, de modo que a detecção e avaliação desses genes nos permitem traçar abordagens assertivas para eliminar o microrganismo de forma mais eficaz como fizeram Sousa *et al*. (2020) ao avaliarem cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de animais envolvidos em casos de mastite subclínica, visando à detecção dos genes *icaA*, *icaD, bap* (proteína Bap), ambos relacionadas a formação de biofilme, *blaZ* e *mecA* (resistência aos antibióticos β lactâmicos) e *nuc* (produção de enterotoxinas) por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, em inglês), e os resultados com os 33 isolados testados revelaram que 39,4% foram *S. aureus* positivos para gene *nuc*, 61,5% foram positivos para gene *blaZ*, 7,6% positivos para o gene *meC* e *icaD*, 15,4% positivos para os genes *icaA* e *bap*, nenhum isolado foi positivo para o gene *mecA* e um isolado foi positivo para quatro dos seis genes pesquisados. Ainda, Sousa *et al.* (2020) destaca a relevância da caracterização genotípica por permitir o conhecimento a nível de espécie, haja vista os estudos realizados pela equipe que permitiram identificar isolados de *S. aureus* causadores de mastite subclínica apresentando fatores de virulência como potencial de produção de biofilme e perfil de resistência a antimicrobianos em pequenos ruminantes.

Adame-Gómez*et al*. (2021) testaram cepas isoladas de pele de úbere bovino por PCR “end-point” - comumente usados para detectar a presença de genes alvos e a abundância relativa no final da reação - para identificar o gene *femA* (que codifica uma proteína importante para resistência a meticilina) e assim obtiveram a confirmação de se tratar de *S. aureus*. O mesmo método foi aplicado nesses mesmos isolados para detecção dos genes *saK*, *hlB*, *pvL*, *tsst*-1, *seA*, *seB*, *seC*, *seD* e *seE* que são codificantes de resistência a meticilina, de β-hemolisina, de estafiloquinase, de

toxina Panton Valentine, de toxina da síndrome do choque tóxico e de enterotoxinas, respectivamente.

Um dos mecanismos de resistência de bactérias e o mais marcante de *S. aureus* é a presença de bombas de efluxo, que são proteínas transmembrana que atuam transportando moléculas de substâncias nocivas para fora da célula bacteriana, com a finalidade de manter sua homeostase ao expulsar tais substâncias tóxicas (GUEDES, 2021). Por serem mais rápidas que a difusão por membrana plasmática, as bombas de efluxo são mais eficientes na resistência e persistência bacteriana (OPPERMAN & NGUYEN, 2015). Esse mecanismo de resistência é conhecido desde o fim dos anos 70 e início dos anos 80, e a percepção da existência e funcionamento deste mecanismo permitiu que se estudasse o papel de bombas de efluxo descritas por Loureiro *et al*., 2016 e Guedes, 2021. Como os demais fatores de virulência, as bombas de efluxo têm sua ação mediada por expressão gênica, de modo que conhecer os genes que regulam o funcionamento das bombas de efluxo permite a articulação de métodos de detecção específica como da bomba de efluxo que impede a ação de antibióticos e substâncias de amônio quaternário sobre *S. aureus* (ALMEIDA *et al*., 2020; SCHERF *et al*., 2020).

Podem ser classificadas dentro de cinco famílias de acordo com a fonte de energia usada para o efluxo das bombas, podendo essa fonte ser primária quando se utiliza de ATP (PIDDOCK, 2006) e secundária quando se utiliza de força próton motora (MOREIRA, 2008). As cinco famílias de bombas de efluxo compreendem:

1) ABC (*ATP binding cassete*) - transporte primário
2) MFS (*Major facilitator subfamily*) - transporte secundário
3) SMR (*Small multidrug resistance*) - transporte secundário
4) RND (*Resistance modulation division*) - transporte secundário
5) MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*) - transporte secundário (SUN, DENG, YAN, 2014).

Sun *et al.* (2014) alegou que das cinco famílias, a RND é exclusiva de bactérias Gram negativas, e as demais estão presentes tanto em Gram negativas quanto em Gram positivas. Assim, *Staphylococcus* spp. expressam bombas de efluxo de mais de uma família.

Como a função das bombas de efluxo é a de extrusão do que é potencialmente tóxico, além de antibióticos e antimicrobianos, essas bombas também expulsam antissépticos, detergentes e substâncias orgânicas do próprio hospedeiro (como bile,

hormônios e moléculas de defesa) o que facilita a permanência da bactéria nos organismos e ambientes, otimizando a patogenicidade de *S. aureus* nos contextos de saúde ambiental, animal e humana (GUEDES, 2021).

Costa *et al.* (2018) afirma que NorA é o sistema de efluxo de *S. aureus* mais bem estudado, e por isso, usado como modelo de investigação da resistência mediada por sistema de efluxo, sendo este sistema associado a resistência a antibióticos, antissépticos e desinfetantes, havendo relatos de que este seja o mecanismo de resposta de primeira linha de resistência a antimicrobianos de *S. aures.* A bomba NorA, da família MFS, é sintetizada pela expressão do gene *norA* e confere resistência a cloranfenicol, fluoroquinolonas (PIDDOCK, 2006) e a substâncias lipofílicas e monocationas (TINTINO, 2018).

Bombas de efluxo já identificadas em cepas de *S. aureus* incluem diversas famílias como as bombas NorA e Tet (K) da família MFS e a bomba MrSA da família ABC, que conferem resistência a quinolonas, cloranfenicol, tetraciclina e alguns macrolídeos, respectivamente (PANTOSTI, SANCHINI, MONACO, 2007; TINTINO, 2018).

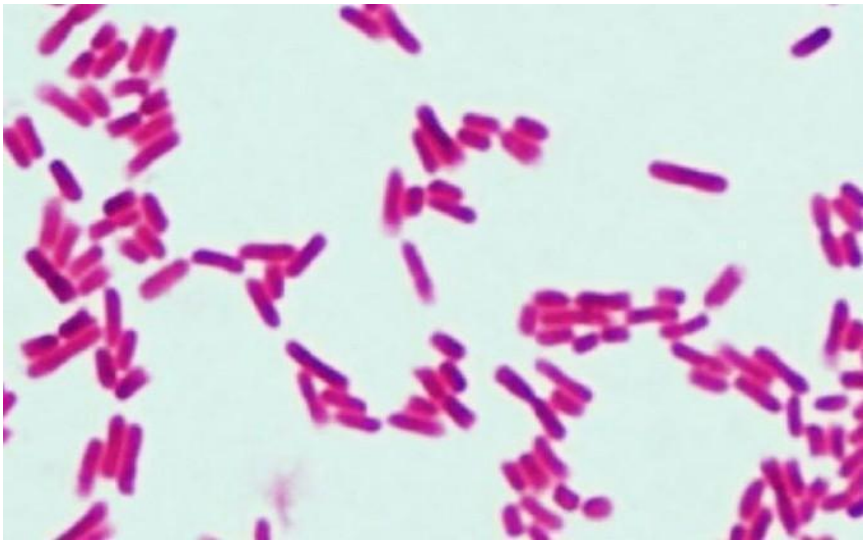
No contexto de inibição de bombas de efluxo, substâncias naturais vêm sendo avaliadas como potenciais inibidores e contribuintes para a redução da resistência e disseminação bacteriana segundo Miladi *et al.* (2017) e Tintino (2018). Assis (2020) avaliou o potencial de eugenol e óleo essencial de cravo frente a bombas de efluxo comparando seu efeito ao do antimicrobiano oxacilina.

Tintino (2018) em seu estudo de avaliação da inibição de bombas de efluxo por substâncias naturais constatou que vitaminas lipossolúveis e ácido tânico foram capazes de reduzir o sistema de efluxo das cepas analisadas em diferentes níveis. Enquanto que Brown *et al*. (2021) mostraram a eficácia de nove extratos vegetais na inibição de bombas de efluxo de cepas de *Staphylococcus aureus*, sendo sugerida pelo estudo a aplicação tópica ou a associação a antibióticos.

1.4.2 ***Escherichia coli***

O gênero *Escherichia* é composto por espécies de bacilos Gram negativos (Figura 9), anaeróbios facultativos, termossensíveis, sendo cepas como *E. coli* indicadores de contaminação fecal por se tratar de coliformes (LAVEN, ASHMORES, STEWART, 2003).

Figura 9- *Escherichia coli*



Fonte: Encyclopedia Britannica.

Escherichia coli é um grupo heterogêneo de patógenos de alimentos emergentes, sendo estas inicialmente bactérias não patogênicas que fazem parte da microbiota intestinal de animais e humanos homeotérmicos. No entanto, há subgrupos que, por possuírem fatores de virulência, se converteram em cepas patogênicas de grande potencial cujas infecções, quando bem sucedidas, causam enormes prejuízos econômicos e sociais (CALDORIN et al., 2013; DALE & WOODFORD, 2015).

A transmissão E*. coli* pode ser direta por meio da ingestão de alimentos contaminados, ou indireta por meio do preparo desses alimentos, sendo assim o principal microrganismo relacionado a essa cadeia de transmissão (GUTH *et al*.,2002; YATSUYANAGI *et al*.,2002; SOUSA, 2006).

Em bovinos, *E. coli* pode ser contraída no ambiente da pastagem, por exemplo, e está associada à mastite aguda e de cura espontânea na maioria das vezes. No entanto, existem os casos de morte por mastite relacionadas ao sucesso da infecção por este patógeno em vacas e de sua transmissão a humanos por meio de produtos lácteos (RINALDI, 2010; CONTRERAS & RODRIGUEZ, 2011;DA SILVA, 2022).

Representantes deste grupo costumam ser categorizados em cepas comensais, cepas patogênicas intestinais (ou diarreiogênicas) e cepas extraintestinais cujas diferenças na classificação se dão principalmente em relação a presença e

manifestação de fatores de virulência (CLERMONT *et al*., 2013). Os patotipos de *E. coli*, ou seja, os que apresentam fatores de virulência, são classificados nos seguintes grupos: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* com aderência difusa (DAEC), *E. coli* enterohemorrágicas/ produtoras de toxina Shiga (EHEC/STEC), e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). Esses tipos constituem um dos principais problemas de saúde pública e surtos alimentares em países em desenvolvimento (CALDORIN *et al*., 2013; NAVARRO *et al*., 2017).

Von Sydow *et al.* (2006) realizou ensaio de PCR multiplex para investigar genes codificantes de fatores de virulência em isolados de *E. coli ,* sendo esses genes STa (gene codificante de toxina termolábil A) , STb (gene codificante de toxina termolábil B), LT (gene codificante de proteína termolábil), VT1 (gene codificante de verotoxina/toxina-shiga 1), VT2 (gene codificante de verotoxina/toxina-shiga 2), *afa* (gene codificante da adesina fimbrial), *sfa* (gene codificante da fímbria S), *pap* (gene codificante depili associada a pielonefrite), *era* (gene codificante de aerobactina), *cnf* (gene codificante do fator citotóxico necrotizante) e *hly* (gene codificante da alfa hemolisina). Os autores investigaram 196 estirpes de *E. coli* isoladas, 123 (62,75%) apresentaram um ou mais dos fatores de virulência investigados.

Sua capacidade de causar doenças se deve aos fatores de virulência expressos pela codificação de genes plasmidiais e/ou cromossômicos, em que a patogenicidade muito se relaciona com a interação da bactéria com as células do hospedeiro, invasão de seus tecidos e produção de toxinas. Os fatores de virulência são produzidos durante sua multiplicação e quando ganham acesso à corrente sanguínea provocam sinais clínicos em poucas horas e a gravidade do quadro varia de acordo com a imunidade do hospedeiro (DONNENBERG & WHITTAM, 2001; SANTOS & FONSECA, 2007).

Os genes de virulência de *E.coli* podem ainda codificar adesinas (moléculas fixadoras), invasinas (moléculas invasoras de outras células), sideróforos (aquisição de moléculas de ferro) e proteínas de membrana para evadir o sistema imune do hospedeiro sendo a maioria desses fatores de virulência codificados por elementos genéticos móveis. Esses elementos podem ter origem variadas, podendo ser bacteriófagos, plasmídeos e transposons, que são transferidos entre bactérias de diferentes grupos taxonômicos e, quando acumulados podem gerar resistência de alto nível (LEVY & MARSHALL, 2004; CROXEN et al., 2013).

Levy& Marshall (2004) afirmam que *E.coli* e demais representantes da família *Enterobacteriaceae* se tornaram resistentes à fluoroquinolona por causa de mutações na topoisomerase e aumento da expressão de proteínas de membrana.

Ao formar biofilmes, a síntese de flagelo em *E. coli* é inibida, haja vista que o biofilme torna as bactérias sésseis, e este quando formado confere resistência a ampicilina, cefotaxima, norfloxacino e ao ácido nalidíxico, de modo que a resistência conferida pelos biofilmes permite suas infecções persistentes (SHARMA *et al.,* 2016, RAITZ, 2022).

1.4.2.1 **Mecanismos de resistência de *Escherichia coli***

A transmissibilidade de *E. coli* entre bovinos e humanos e sua capacidade de causar infecções bem-sucedidas e persistentes em ambos torna a resistência a antimicrobianos por parte destas bactérias preocupante tanto para a saúde humana, quanto animal. É importante avaliar sua resistência em níveis fenotípicos e genotípicos por causa da ameaça que ela representa para saúde e meio ambiente (DA SILVA, 2022; FAZEL *et al*., 2019).

Bactérias podem resistir a vários antimicrobianos de mesma classe (co-seleção) e a antimicrobianos de várias classes (seleção cruzada). Genes que conferem resistência e virulência podem estar perto um dos outros em elementos genéticos móveis (EGMs), tornando as cepas mais resistentes, mais patogênicas e mais virulentas, sendo denominadas de superbactérias. *E. coli* é uma eficiente transmissora e receptora de EGMs e genes de resistência (LEVY & MARSHALL, 2004; CROXEN et al., 2013; LERMINIAUX & CAMERON, 2019).

O uso de polimixina na medicina veterinária e o aumento de resistência à colistina por pressão seletiva têm sido reportados em vários países com notificação de cepas de *E. coli* resistentes, e nesse contexto, Liu *et al.* (2016) relatam que a resistência a polimixina dada pelo gene *mcr* está presente em elementos genéticos móveis e tem alta capacidade de disseminação entre as cepas portadoras de genes de resistência sendo também presente em genes cromossômicos. As bactérias portadoras do gene *mcr* podem também ter o gene *floR* que confere resistência a florfenicol, antibiótico de uso exclusivo veterinário (LIU *et al.* ,2016; FERREIRA, 2022; POIREL *et al.*, 2018).

Um dos mecanismos de resistência característicos de *E. coli* é a alteração da permeabilidade de membrana pela diminuição das porinas codificadas no genoma

bacteriano, pelo controle da expressão de alguns tipos de porinas ou por alterações estruturais que as tornam mais seletivas, sendo *OmpF* e *OmpC* as porinas de *E. coli* mais bem caracterizadas. A alteração de permeabilidade de membrana promove baixos níveis de resistência, esse mecanismo geralmente é associado a outro mecanismo de bombas de efluxo (FERREIRA, 2022; IMPEY *et al*., 2020). As bombas de efluxo promovem a extrusão de antimicrobianos, e diminuem sua capacidade de ação ao reduzir sua concentração e tempo de ação no interior da célula bacteriana e especialmente em *E. coli,* são relevantes para a resistência a tetraciclinas e fluoroquinolonas (bomba de efluxo *QepA*). AcrAB-TolC é uma das bombas tripartidas que são expressas constitutivamente em *Escherichia coli* (*E. coli*), e seus homólogos foram identificados em todos os patógenos Gram negativos, e implicados em altos níveis de resistência a antibióticos em vários isolados clínicos. Uma característica notável nesse sistema, é a ampla gama de substratos que são reconhecidos conferindo resistência em *E. coli* a uma variedade de drogas lipofílicas e anfifílicas, corantes e moléculas de detergente que incluem tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, β-lactamases ,eritromicina, ácido fusídico, brometo de etídio, violeta cristal, dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate), e ácidos biliares (CHEN *ET al.,* 2021; FERREIRA, 2022; MUNITA & ARIAS, 2016; RAY *et al*., 2021; IMPEY *et al*., 2020).

Outros mecanismos de resistência comum a este grupo são alteração e inativação enzimática por dois tipos de enzimas: um tipo que degrada as moléculas do antimicrobiano, sendo um excelente e clássico exemplo, as β-lactamases, que destroem o anel β-lactâmico central da classe β-lactâmicos. Outro tipo que catalisa modificações químicas, como as enzimas que promovem acetilação, adenilação e fosforilação das classes aminoglicosídeos e cloranfenicol (RAY *et al*., 2021).

Ainda no que se referem as enzimas de degradação do agente microbiano, as β-lactamases são predominantes em bactérias Gram-negativas e codificadas tanto por genes cromossômicos quanto por genes de elementos genéticos móveis, e por ser a classe de β-lactâmicos abrangente, contento subgrupos com vários representantes, há também por parte das bactérias uma gama extensa e diversificada dessas enzimas degradadoras a fim de assegurar sua eficiência na inativação dessa classe de agentes antimicrobianos. A abrangência na produção de β-lactamases favorece a capacidade de alguns grupos bacterianos, como *E. coli* propriamente, de apresentar um fenótipo multirresistente quando esta capacidade de produção de

enzimas inativadoras vem acompanhada de demais fatores de virulência, como no caso das cepas ESBL (produtoras de β-lactamases de amplo espectro, em inglês), que são uma enorme preocupação quando se considera o possível consumo de alimentos de origem animal contaminados pelas mesmas (HAENNI *et al*., 2014; OLSEN *et al*., 2014; HAO *et al*.,2016; MUNITA & ARIAS, 2016; RAY *et al*., 2021; CECCARELLI *et al*.,2019).

1.4.3 **A Formação de Biofilme e a Mastite Bovina**

Biofilme é uma comunidade multicelular complexa envolta e mantida por matriz extracelular polimérica autoproduzida, por meio do qual um consórcio bacteriano se adere a superfícies bióticas e abióticas, com impacto na área médica, industrial, de produção animal e no meio ambiente pois promovem a sobrevivência e tolerância a estresses ambientais, favorecem contaminações cruzadas e o estabelecimento de infecções (MARQUES *et al*.,2014; 2016; SATPATHY *et al*., 2016; MIAO *et al*., 2017; MAURICE, BEDI, SADKIT, 2018).

A formação de biofilme é um fator de virulência determinante para fisiopatologia da mastite bovina por promover adesão e colonização muito mais facilitadas do epitélio glandular mamário e assim, dificultar a ação do sistema imunológico sobre essas bactérias (MARQUES *et al*., 2014; 2016; SATPATHY *et al*., 2016; MIAO *et al*., 2017).

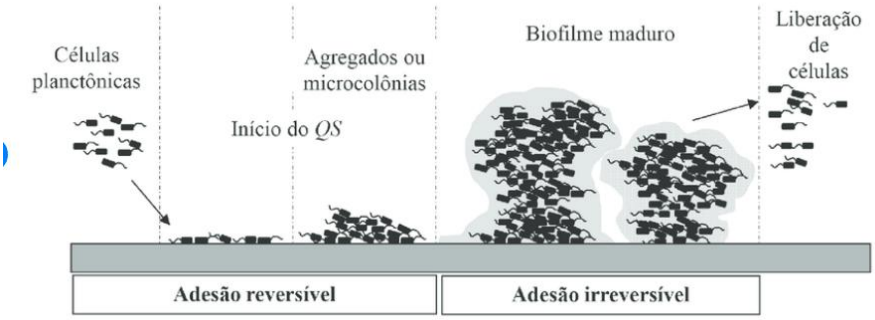
. A formação dos biofilmes compreende 5 etapas:

1. Adesão ao substrato por células planctônicas;
2. Adsorção e Multiplicação;
3. Desenvolvimento da arquitetura do biofilme;
4. Maturação, pela produção de polímeros extracelulares;
5. Dispersão, que reinicia o ciclo (SATPATHY et al., 2016).

Thi, Wibowo, Rehm (2020) em seu trabalho discorrem que na segunda fase da formação de biofilmes as células bacterianas estão irreversivelmente aderidas - uma intensificação da aderência da primeira fase- o que permite que na terceira fase estas se multipliquem de modo a formar microcolônias. Na quarta fase essas microcolônias assumem estrutura tridimensional com formato semelhante a cogumelos enquanto na

quinta fase, a autólise de microcolônias libera células dispersas que reiniciam o ciclo de formação de biofilmes em outros locos (Figura 10).

Figura 10- Formação de biofilme bacteriano.



Fonte: Adaptado de Macedo & Abraham (2009)

Quadro 3- Constituintes do biofilme bacteriano

Componente	**Porcentagem da matriz**
Água	~ 90%
Células microbianas (mono ou multi espécie)	2 - 5%
Polissacarídeos (homo e hetero)	1 - 2%
Proteínas (inclusive enzimas)	< 1 - 2%
RNA e DNA	1- 2 %

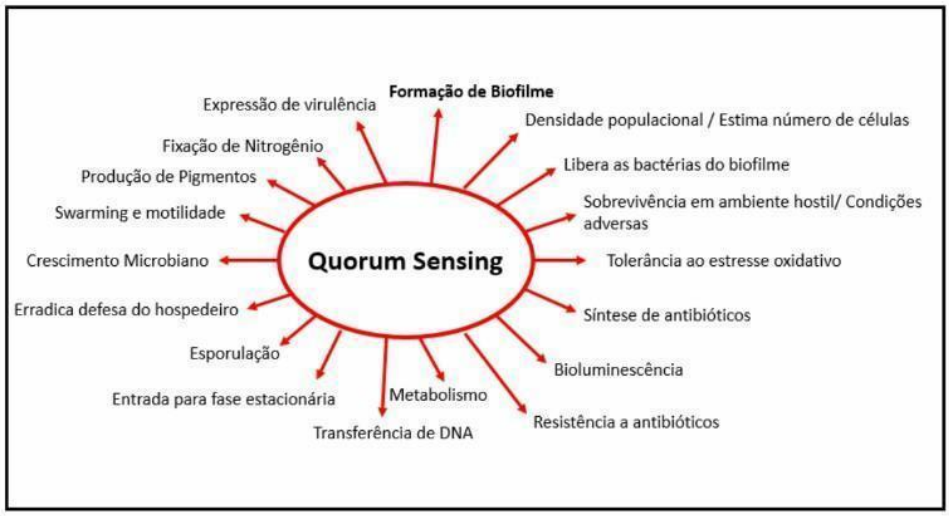
Fonte: Adaptado de Casolini, 2008; e Abrantes e Nogueira, 2022.

A matriz do biofilme bacteriano contém majoritariamente de água (cerca de 90%), polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, surfactantes e cátions (Quadro 3), cuja composição varia de acordo com as espécies constituintes e condições de crescimento (LÓPEZ *et al*., 2010; TREMBLAY, HATHROUBI, JACQUES, 2014; MAURICE, BEDI, SADKIT, 2018).

O aumento da concentração de células aderidas entre si estimula o aumento da produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras, isso porque por meio do *Quorum Sensing* (Figura 11), a comunicação celular intraespécie e interespécie

que leva ao aumento populacional das bactérias agregadas, que por meio de comunicação química, induz e potencializa a produção de substâncias promotoras da sobrevivência bacteriana e sua melhor organização dentro de biofilmes bacterianos (TRENTIN, GIORDANI, MACEDO, 2013; LAILA & SANTOS, 2016).

Figura 11- Funções do *Quorum Sensing* (QS) e sua relação com biofilme bacteriano



Fonte: Bhardwaj *et al*., 2014.

O alginato é uma molécula composta pelos ácidos D-manurônico e L-gulurônico, que participa da formação de biofilmes como parte de sua estrutura, promovendo a sobrevivência das bactérias ao formar uma cápsula ao redor delas e assim impedir a difusão de antimicrobianos, a fagocitose e a opsonização pelo sistema imune. Diversos estudos têm sido realizados com essa molécula, devido a sua relevância para a formação e estabelecimento de biofilmes (HAUSER *et al.,* 2011; TENTRIN, GIORDANI, MACEDO, 2013;LAILA & SANTOS, 2016; MORADALI, GHODS, REHM, 2017; CARVALHO *et al.,* 2019).

A cobertura dessas substâncias é o que torna as bactérias presentes nesse envoltório mais resistentes a antimicrobianos, agentes físicos e químicos. Segundo Arcuri (2000) e Melchior *et al.* (2006), a cronicidade da infecção se deve a formação de biofilmes na glândula mamária das fêmeas com mastite, que também seleciona os

microrganismos mais resistentes aos antibióticos comuns ao tratamento da infecção (SAUER *et al*., 2007; OTTO, 2008).

Ainda no tangente a relação entre biofilmes e mastite bovina, é sabido que o biofilme contribui para a persistência das bactérias em sítios infeciosos e em infecções crônicas sendo as que melhor produzem polissacarídeos as que tem maior capacidade de colonização (ISRAEL *et al*., 2018)

Há trabalhos como os de Israel *et al*. (2018) e Cruz *et al*. (2021) que investigaram a capacidade de produção de biofilmes de cepas isoladas de vacas com mastite, o que permite tanto o conhecimento do perfil etiológico dos casos de mastite dentro do gado leiteiro como também pesquisar maneiras mais eficientes de combater a cronificação e reincidências dessas infecções, por vezes mediadas pela formação dos biofilmes. Considerando que bactérias formadoras de biofilme são mais resistentes que bactérias planctônicas já que o mesmo otimiza a promoção da aderência e colonização dos tecidos mamários bovinos, causando reinfecções e propagação de quadros mastísticos e dificultando a resolução da doença e a coexistência de múltiplas espécies bacterianas nos biofilmes desenvolvidos nos tecidos mamários potencializando os efeitos danosos (GARCIA, 2023)

Cruz *et al.* (2021) concluem que existe relação entre aderência de biofilmes e resistência a agentes antimicrobianos como desinfetantes, de maneira que a eficiência da assepesia pré e pós – ordenha e o efeito dos desinfetantes utilizados precisam eliminar tanto um amplo espectro de células microbianas quanto biofilmes em formação e os já consolidados (SOARES *et al.*, 2024)

1.5 **Procedimentos de desinfecção e tratamento convencional na mastite bovina**

1.5.1 **Utilização de desinfetantes pré e pós- *dipping***

A utilização de desinfetantes para limpeza das tetas das vacas leiteiras antes e depois da ordenha é uma medida sanitária que promove a redução da carga microbiana local, e como consequência reduz também a transmissão de agentes etiológicos causadores de mastite, sendo assim uma medida de manejo que comprovadamente elimina de forma drástica microrganismos, e principalmente bactérias, da superfície dos tecidos (FREITAS *et al*., 2011; LOPES *et al*., 2013; BACH *et al*., 2019).

A eficiência dos desinfetantes depende de fatores como concentração ou diluição, tempo de exposição, temperatura, presença de matéria orgânica, local a ser desinfectado, sensibilidade dos microrganismos no local da desinfeção e instrução sanitária dos manipuladores das vacas. Muitos desinfetantes químicos amplamente difundidos comercialmente são utilizados nas etapas sanitárias pré e pós- ordenha, considerando que por não haver o produto desinfetante ideal ou perfeito, a variedade de composições e preços são levados em conta na escolha do desinfetante a ser utilizado junto com aspectos como a não toxicidade para animais e humanos, a boa ação desinfetante e a acessibilidade dos custos. Os mais utilizados comercialmente são: clorexidina, iodo, ácido sulfônico, cloro, hipoclorito de sódio, ácido cloroso e para evitar efeitos indesejáveis emolientes, como glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais e minerais e colágenos são adicionados a estas substâncias (CASSOL, 2010; DOMINGUES, 2010; BACH *et al*., 2019; DE MENDONÇA *et al*., 2020).

Ainda sobre a eficácia dos desinfetantes pré e pós ordenha, trabalhos têm buscado compará-los entre si a fim de se obter algum tipo de padronização de concentração e tempo de exposição. Bach *et al.* (2019) fizeram uma revisão acerca dos principais desinfetantes utilizados e outros pesquisadores realizaram ensaios comparativos aplicando desinfetantes a culturas bacterianas de cepas relacionadas a mastite, como os trabalhos de Ramalho *et al*. (2012), Silva *et al.* (2015), Peixoto *et al.* (2015) e De Mendonça *et al.* (2020). Os autores realizaram ensaios experimentais submetendo espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite em propriedades de produção leiteira a diferentes tempos de exposição e concentrações de desinfetantes. Ramalho *et al*. (2012) utilizaram clorexidina, iodo, cloro, quaternário de amônia, enquanto Silva *et al.* (2015) utilizaram os mesmos desinfetantes apenas substituindo o cloro por hipoclorito de sódio. O primeiro trabalho obteve uma acentuada sensibilidade em diferentes tempos de exposição de cada desinfetante, e o segundo trabalho obteve 100% de redução de carga microbiana em todos os desinfetantes testados em 30 e 60 minutos de exposição.

Peixoto *et al*. (2015) observaram que clorexidina e iodo reduziram a capacidade de adesão dos isolados de *Staphylococcus* spp. e do biofilme já formado apenas das estirpes coagulase negativas. De Mendonça *et al.* (2020) observaram que no tratamento pré-ordenha usando ácido lático, clorexidina e hipoclorito de sódio não houve grande diferença estatística na contagem bacteriana após a desinfeção, mas

que os testes com hipoclorito de sódio apresentaram menor redução da carga microbiana em comparação com os outros.

Ainda que se trate de uma etapa básica e simples, a assepsia das tetas das vacas é fundamental para prevenção e manejo tanto de transmissão quanto de aumento de casos de mastite entre as vacas do gado leiteiro, de modo que além da adequada realização desta assepsia, os desinfetantes utilizados também devem atender os critérios para sua comprovada qualidade asséptica e de fato apresentar como resultado a diminuição da contagem bacteriana de potenciais causadores de mastite bovina, e nesse contexto, a pesquisa científica vem elucidando tais questões e promovendo um melhor aproveitamento das opções disponíveis.

O Quadro 4 apresenta desinfetantes comumente utilizados para assepsia das tetas das vacas leiteiras bem como das áreas em que elas são acomodadas, tendo tais referências guiado a escolha dos desinfetantes utilizados na metodologia do presente trabalho.

Quadro 4- Desinfetantes comumente usados no manejo de vacas leiteiras

Desinfetantes (concentrações para ensaios *in vitro*)	**Referências Bibliográficas**				
	Bach, A.T. *et al*. (2019)	da Silva, L.C.A *et al.* (2014)	Peixoto, M.M.R. *etal*. (2015)	Ramalho *et al*. (2012)	de Mendonça, B.S *et al.* (2020)
Hipoclorito/ Cloro	Hipoclorito a 2,5 %	Hipoclorito a 0,62; 1,25 e 2,5 %	-	Cloro a 2,5 %	Hipoclorito a 2,5 %
**** Iodo**	1 a 2 %	0,5; 1 e 2 %	0,7%	0,57 %	-
Clorexidina	0,5 %	0,5; 1 e 2 %	2 %	2 %	2,5 %
Ácido lático	-	-	-	-	3 %
Amônia quaternária	-	0,17; 0,34 e 0,68 %	-	4 %	

** : Iodo é um desinfetante cada vez menos utilizado por deixar resíduos e causar manchas/escurecimento, mas ainda há estudos que o utilizam .

. Fonte: Autoria própria, publicada em artigo de revisão Silva *et al*., 2024.

1.5.2 **Tratamento convencional de mastite com uso de anti-inflamatórios**

O uso de anti-inflamatórios no tratamento de mastite bovina é comum, e nos casos mais graves, os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) são os utilizados como adjuntos da antibioticoterapia e possuem ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica (SUOJALA *et al*., 2013; OLIVEIRA & RUEGG, 2014; KAYTISING *et al*., 2017).

Os benefícios promovidos pela ação desses medicamentos em associação a administração de antibióticos (como costuma ser em se tratando de gado bovino leiteiro) incluem a redução da CCS, redução da taxa de descarte do leite devido a alterações decorrentes do quadro mastítico, aumento do bem-estar animal no tangente a sintomas de inflamação como dor e inchaço, otimização da resolução da infecção bacteriana e melhor saúde da glândula mamária. No entanto, ainda que confira todos esses benefícios, sua administração precisa ser parcimoniosa a fim de evitar possíveis efeitos gastrointestinais e renais agressivos a depender do fármaco (GEORGE *et al*., 2008, MCDOUGALL *et al*., 2009a, 2016; SWARTZ *et al.,*2018).

Seus efeitos são resultado de seu mecanismo de ação que consiste na inibição da biossíntese de prostaglandinas por meio da competição das moléculas de AINES com as enzimas cicloxigenases (COX), assim, impedindo a cascata inflamatória (VENTURA *et al*., 2021). Um exemplo é o medicamento Animeloxan (Meloxicam 20 mg/mL injetável) cuja ação sobre a COX-2 e efeito residual sobre COX-1 alivia os efeitos inflamatórios com mínimos efeitos adversos e gastrointestinais (Animeloxan. [Livisto]. Portugal:Campifarma; 2019).

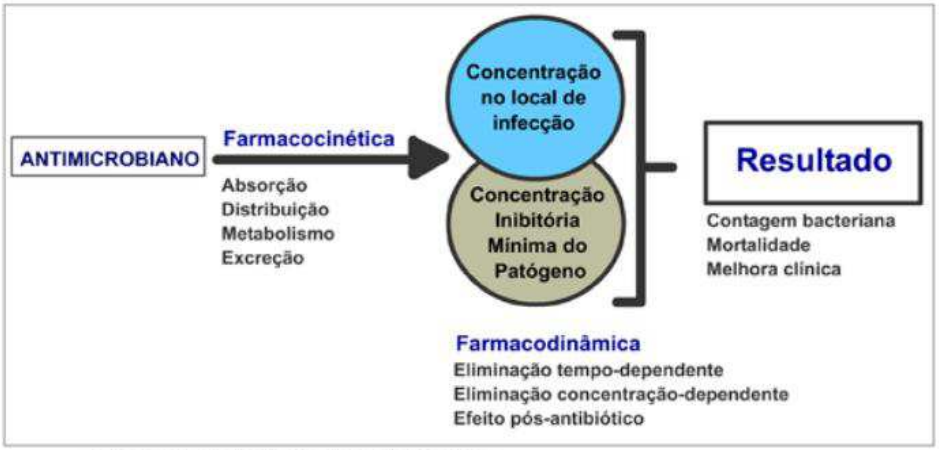
1.5.3 **Tratamento convencional de mastite com uso de antibióticos**

A antibioticoterapia é a maneira mais comum e difundida mundialmente de tratar casos de mastite (CHENG & HAN*,* 2020).

Para seu pleno funcionamento os antibióticos dependem de sua farmacocinética e farmacodinâmica (Figura 12), sendo a concentração adequada ao local da infecção, penetração (ativa ou passiva) na célula bacteriana, interação com

o sítio de ligação no interior da bactéria e sua permanência por tempo suficiente para surtir seu efeito bactericida ou bacteriostático as etapas consecutivas que configuram o sucesso terapêutico de cada mecanismo de ação das diferentes classes de antibióticos (Figura 13).

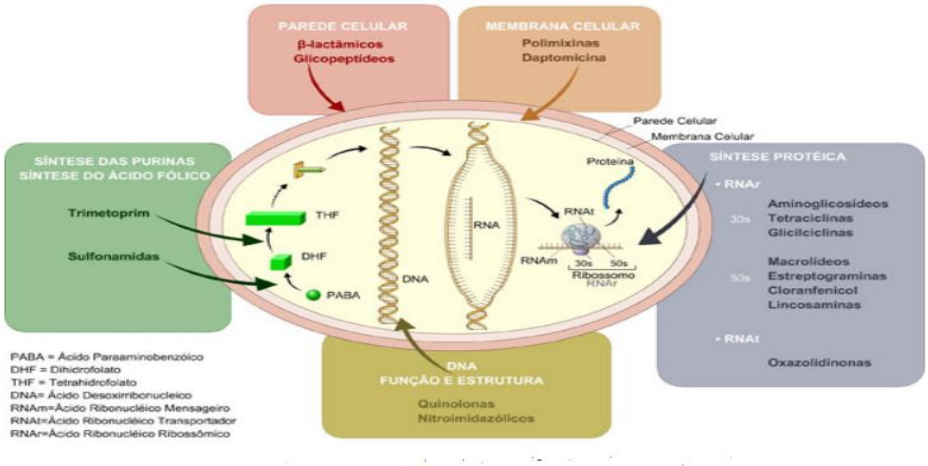
Figura 12- Farmacocinética e farmacodinâmica.



Fatores relacionados à ação dos antimicrobianos.

Fonte: ANVISA, 2007

Figura 13- Mecanismo de ação das classes de antimicrobianos.



Fonte: ANVISA, 2007

Segundo Talebi Bezmin Abadi *et al.* (2019), a cada vez mais longa lista de antibióticos ineficazes se deve muito à resistência, e até multirresistência, e em alguns casos, pan resistência, cada vez mais presentes em espécies bacterianas diversas.

A massividade do uso de antibióticos evidenciou a emergência da questão da resistência e opções terapêuticas disponíveis bem como a capacidade das bactérias de adquirir resistência por sua própria plasticidade metabólica e a transferência horizontal de genes que amplificam a resistência ao permitir que a mesma seja compartilhada entre diversos espécimes. A precariedade dos sistemas de controle e prevenção de infecções torna mais ineficiente a antibioticoterapia, por isso, em 2017 a Organização Mundial da Saúde anunciou a prioridade em buscar opções de novos e efetivos tratamentos antibióticos como uma estratégia de minimizar essa ameaça global à saúde ambiental, animal e humana (ED-DRA et al., 2017; ONICIUC *et al.*, 2017; WHO, 2017; TALEBI BEZMIN ABADI *et al.*, 2019).

Em 2020, a OMS declarou que a resistência a antimicrobianos é um dos principais problemas do século XXI e que até 2050, será a causa direta de cerca de 10 milhões de óbitos anuais em todo o mundo (CHÁVEZ-JACOBO, 2020; GSK, 2020).

A resistência a antimicrobianos no contexto da saúde animal envolvendo pecuária leiteira tem relevância devido ao fato de que essas classes de antibióticos são muito empregadas para controle de mastite bovina em todo o mundo e por serem fármacos de amplo espectro que frente a versatilidade dos mecanismos de resistência bacteriana têm sua ação limitada. Somado ao fato de que o uso indiscriminado de antibióticos é majoritariamente em animais, promovendo a seleção de microrganismos resistentes (LOUREIRO *et al*., 2016; DA SILVA & HOLLENBACH, 2020).

Com o aumento da resistência, por consequência há a diminuição dos fármacos para controle dessas infecções de forma inversamente proporcional, assim, o uso exclusivo de antimicrobianos não é a mais eficiente das abordagens, considerando o tempo de tratamento e a dose utilizada (WIMMERSTED & KAHLMELTER, 2008; GUEDES, 2021). Conhecer a dinâmica das estratégias de resistência bacteriana é determinante para controle e mitigação da mesma, o que inclui identificar mecanismos de defesa diversos (ex. bombas de efluxo) e os genes que os codificam em cepas frequentemente associadas à mastite bovina (GUEDES, 2021).

Sharma *et al.* (2019) e Monteiro (2021) em seus trabalhos sugerem alternativas ao uso de antibiótico para combate a infecções bacterianas bovinas e a resistência a antimicrobianos, pois além dos mecanismos de resistência desenvolvidos e compartilhados entre as células bacterianas, tais mecanismos são otimizados quando as mesmas formam ou se associam a biofilmes. O Quadro 5 exemplifica as alternativas propostas pelos trabalhos e sua ação no combate às infecções.

Quadro 5- Alternativas para antibióticos convencionais.

Alternativa a antibióticos	**Exemplos**	**Função/ Ação**	**Fontes Bibliográficas**
Nanopartículas	**Orgânicas:** Nanoesferas poliméricas, nanocápsulas poliméricas, micelas poliméricas,lipossomos, dendrímeros.	Toxicidade dos metais incorporados impede o crescimento bacteriano; impedem a síntese de moléculas extracelulares por parte das bactérias; administrar pequenas concentrações de agentes antimicrobianos;	BAEK & AN (2011); HERNÁNDEZ-SIERRA *et al*. (2008); HOCHBAUM *et al*. (2011); IANNITELLI *et al.*(2011); ZAIDI, MISBA, KHAN. (2017)
	Inorgânicas: Nanopartículas de silicamesoporosa, nanopartículas de óxido de Ferro, nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro, ponto quântico.		
Terapia fotodinâmica	Corantes fenotiazínicos combinados a fracionamento por luz; fotossensibilizador conjugado a nanopartículas;	Fracionamento do biofilme por meio de luz; redução da viabilidade celular bacteriana por tempo de exposição; fotoinativação e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) mata as células bacterianas	MISBA & KHAN. (2018); MISBA, KULSHRESKA, KHAN. (2016); MISBA, ZAIDI, KHAN. (2017);
Enzimas degradadoras de matriz de biofilme	DNAse I, DspB, α-amilase, ácido D-amino entre outras.	Desassociam moléculas de biofilmes já formados e impedem que bactérias liberem tais moléculas para formação de novos (e sem causar irritação nas células dos hospedeiros);	KOLODIKIN *et al*. (2010, 2012).; KULSHRESTHA *et al*. (2014); LÖNN-STENNSRUD *et al*. (2009); SUN *et a*l. (2013); TETZ *et a*l. (2009).
CRISPR/Cas	Edição de genes alvo reduzindo a virulência e resistência a antimicrobianos por parte das bactérias de modo que o sistema CRISPR/Cas interfira no reconhecimento dos genes e sua codificação em moléculas.	Inibição da formação de biofilmes por meio de CRISPRi suprimindo os genes *fimHeluxS*	ZUBERI, AHMAD, KHAN. (2017a, 2017b); PURSEY *et al.* (2018); GHOLIZADEH *et al*. (2020).

Pulsoterapia acústica	Geração de pulsos acústicos (ondas de choque) proveniente de energia cinética resultando do impacto balístico entre duas estruturas, sendo estes pulsos direcionados a um tecido biológico	Micro-roturas capilares promovem a liberação de fatores de crescimento no local do tratamento a fim de que a angiogênese resultante da remodelação das arteríolas melhores o aporte sanguíneo, a oxigenação e a cicatrização dos tecidos	KISH *et a*l. (2016); ZESSLER *et al.*(2017); LEITNER *et al*. (2018, 2021); MONTEIRO *et al*. (2021); BLUM *et al*. (2023)
Substâncias/Substâncias naturais	Óleos essenciais; extratos vegetais; substâncias isoladas de extratos naturais;	Inibição de crescimento bacteriano e de formação de biofilme e de unidades formadoras de colônia (UFC) por difusão em disco e por concentração mínima inibitória (CMI).	POZZO *et al*. (2011); CASTRO *et al.* (2015); NASCIMENTO *et al*. (2017); NADER et al. (2018).

Fonte: Adaptado de SHARMA *et al*. (2019) e MONTEIRO (2021)

Entre suas sugestões de abordagens alternativas à antibioticoterapia supracitadas Sharma *et al*. (2019) propõem a utilização de substâncias naturais derivadas de plantas (SILVA *et al*., 2024). Enquanto opções de tratamento para a medicina veterinária e principalmente para os casos de mastite bovina, as substâncias naturais têm relevância excepcional por possibilitar que atuem no combate a infecções de forma segura, pouco custosa e evasiva aos mecanismos de resistência das bactérias. Diversos estudos têm buscado melhorias e inovação na medicina veterinária de forma a mitigar tanto os problemas de saúde animal, quanto de prejuízos ao produtor de leite e dos danos ambientais ambos os três ocasionados pelo grande contingente de resíduos de antibióticos dispersos nos ambientes (solo, água, e ambientes rural, industrial e doméstico).

1.6 **Produtos Naturais e a medicina Veterinária**

1.6.1 **Produtos naturais no tratamento da Mastite Bovina no Brasil**

Produtos naturais como óleos essenciais, extratos de plantas, bacteriocinas e fitoderivados são descritos como tratamento alternativo para mastite (BASKARAN *et al*., 2009; HÖFERL *et al*., 2009; PIETERSE *et al*., 2010; MUBARACK *et al*., 2011; SILVA *et al*., 2024). Dafererа*et al.* (2003) e Oliveira-Tintino *et al.* (2018) em seus trabalhos mostraram que substâncias de origem vegetal e seus derivados são uma alternativa viável e eficiente pela complexidade das estruturas dessas substâncias que escapam às adaptações bacterianas.

A exploração de possíveis antimicrobianos naturais vem aumentando em partes pela preocupação com a resistência aos antimicrobianos e sanitizantes convencionais e pelo alto custo envolvendo a produção de novas moléculas sintéticas que sejam eficientes. Espécies vegetais com propriedades antimicrobianas comprovadas e/ou em compravação se tornam alvo de interesse para a formulação de novas drogas que superem a resistência microbiana e sejam viáveis economicamente, (GUIMARÃES, 2010; NADER *et al*., 2018).

Pozzo *et al.* (2011) comparam o efeito antibacteriano de óleos essenciais com penicilina, eritromicina e tetraciclina ao observar a susceptibilidade e resistência de *Staphylococcus* spp., tendo *S. aureus* ATCC 29213 como cepa de referência. Os óleos essenciais, como produtos naturais, são seguros, têm comprovada atividade antimicrobiana e a resistência por parte dos microrganismos posterior a exposição prolongada ainda não foi descrita, o que corrobora seu uso como opção viável para o tratamento de mastite. Segundo Pozzatti *et al.* (2010) as substâncias fenólicas dos extratos vegetais e óleos essenciais são responsáveis por grande parte do efeito antimicrobiano visto que estão em maior quantidade.

Os resultados da investigação de Pozzo *et al.* (2011) mostraram que a atividade antimicrobiana sobre os subgrupos de *Staphylococcus* spp. parcialmente independentes dos perfis de resistência, muito se relaciona com suas substâncias fenólicos e demais componentes, e que por essa razão, óleos essenciais e fitoderivados são boas alternativas para o tratamento de mastite bovina. Resultados corroborados por Mahboubi & Bidgoli (2010) e Pozzatti *et al*. (2010).

Nascimento *et al.* (2017) mostra o potencial de extrato vegetal de *Plectranthus ornatos* Codd. (*Lamiaceae*), popularmente chamada de boldinho, para inibir biofilmes de cepas de *S. aureus* resistentes isoladas de animais com mastite. Foi demonstrado o uso das folhas desta planta como antibiótico para tratar infecções dérmicas (BRASILEIRO *et al*., 2006; DIAZ *et al*., 2010). Marinho *et al.* (2007) afirmam que alguns fazendeiros brasileiros têm usado *P. ornatus* para tratar mastite em animais leiteiros, com resultados significativos. As fitosubstâncias do extrato das folhas de *P. ornatus* foram identificadas, bem como avaliadas as atividades antimicrobianas e de inibição de biofilme, e os resultados do trabalho revelam o potencial desses extratos como sanitizantes, adjuvantes e a capacidade de inibir a formação de biofilmes das cepas utilizadas no estudo. Resultados similares e que confirmam essas conclusões são os de Duarte *et al.* (2004), Virtuoso *et al.* (2005) e Nostro *et al*. (2007).

Nader *et al.* (2018) considerando o potencial terapêutico de plantas, usou em seu estudo a planta nativa do cerrado brasileiro, *Croton urucurana*, para avaliação do potencial anti biofilme *in vitro* sobre *S. aureus* isolados do leite de vacas com mastite. O grupo de pesquisadores obtiveram resultados promissores tanto no uso do extrato como com os fitosubstâncias isolados para inibir a formação biofilme por *S. aureus*. Outros trabalhos também demostraram que extratos vegetais e suas substâncias isoladas apresentaram resultados significativos quanto ao potencial antimicrobiano e anti biofilme contra *S. aureus* (FREIRE *et al*., 2009, OLIVEIRA, 2011, SAISING *et al*.,2011, *et al*.,2012).

Guimarães *et al.* (2010) têm seu trabalho corroborado por Nascimento *et al*. (2017) e Nader *et al*. (2018), que afirmaram que a pesquisa estratégica com produtos naturais antimicrobianos, no caso fitocomplexos e fitoderivados, podem acelerar o processo e reduzir o custo de produção de substâncias e surgimento de alternativas aos antimicrobianos tradicionais, e tais alternativas podem colaborar para a mitigação de microrganismos multirresistentes.

Fontaine *et al.* (2014) em seu trabalho mostrou a susceptibilidade da bomba de efluxo NorA de *S. aureus a* produtos naturais.Tintino (2018) avaliou o efeito que substâncias naturais sobre bombas de efluxo e constatou que vitaminas lipossolúveis e ácido tânico, em diferentes níveis, reduziram o sistema de efluxo das cepas analisadas. Brown *et al.* (2021) em sua investigação indicam que 9 extratos vegetais foram eficazes na inibição de bombas de efluxo das cepas de *S.aureus* utilizadas no estudo. Os autores sugerem que esses extratos poderiam ser aplicados de forma

tópica em algumas infecções ou ainda serem associados a antibióticos com a finalidade de ampliar a eficácia.

Nas duas últimas décadas a investigação das atividades antimicrobianas de extratos e componentes vegetais tem aumentado e se concentram nos mesmos gêneros e espécies vegetais (SILVA, 2013; LIMA NETO *et al*., 2015; TOMAZELI *et al*., 2019; BARROS *et al*., 2020; BELÉM *et al*., 2021; DE OLIVEIRA & DA SILVA; 2022; QUARESMA *et al*., 2023).

Considerando esta escassez de dados, a necessidade de maior diversidade de espécies e ensaios mais robustos que Thielmann *et al*. (2019) realizaram a investigação da atividade antimicrobiana de 179 óleos essenciais de 86 espécies de plantas com a finalidade de que, com esses dados, a discussão sobre o potencial antimicrobiano de derivados vegetais fosse normalizada e mais bem explorada. O estudo foi realizado com as cepas recomendadas para teste de susceptibilidade de *E. coli* DSM 1103 e *S. aureus* DSM 1104.

O estudo usou a concentração mínima inibitória de óleos essenciais extraídos das diferentes espécies de plantas sendo a concentração padrão estabelecida para o teste, a de 400 µg/mL em que a maioria apresentou alguma atividade inibitória contra as bactérias testadas. Em sua grande maioria, os óleos inibiram em maior escala bactérias Gram-positivas (*S. aureus* DMS 1104) do que Gram-negativas (*E. coli* DSM 1103). Das 46 amostras de óleos essenciais testadas contra *S. aureus*, 30 apresentaram atividade inibitória, sendo que dessas, 12 apresentaram inibição a 50 µg/mL. Quanto à *E. coli*, 22 amostras de extratos inibiram o crescimento bacteriano, sendo que, 12 gêneros com atividade inibitória, cabendo ressaltar que 4 gêneros inibiram *E. coli* a 50 µg/mL e 9 inibiram entre 100 a 400 µg/mL. Os autores deste trabalho ressaltaram que, em se tratando pesquisa por atividade antimicrobiana de extratos vegetais e óleos essenciais, os ensaios que usam múltiplos extratos e óleos de múltiplas espécies e gêneros a fim de determinar concentrações inibitórias padrões são menos frequentes que os estudos usando apenas um único extrato, óleo essencial, espécie ou gênero vegetal. Assim, tanto Lambert *et al.* (2001) quanto Xu (2008), Paparella *et al.* (2008) e Thielmann *et al.* (2019) defendem que o trabalho continuado da pesquisa com fitoderivados (óleos essenciais, extratos, hidrolatos, substâncias isoladas) tanto para investigação de novas substâncias quanto para estudo mais aprofundado de substâncias conhecidas deve ser mantido para a

descrição mais abrangente dos fitoderivados e suas frações e para elucidação do mecanismo de ação celular que confere suas atividades antimicrobianas.

Embora existam numerosos estudos discutindo o potencial de substâncias naturais como alternativa para uso como antimicrobianos em animais de produção, somente um número limitado desses estudos apresentam evidências científicas robustas, a maioria apresenta poucos dados da eficácia de acordo com o manual para uso de produtos naturais em animais da Comissão Europeia (The European Food Safety Authority - EFSA) e a Agência de Medicina Europeia (EMA). As fitosubstâncias exercem sua atividade antibacteriana por efeitos na morfologia bacteriana, na parede celular, na membrana celular, nas sínteses e estrutura das proteínas, como também na síntese de ácidos nucleicos e de biofilmes e inibição da cadeia metabólica. Diversos estudos demonstraram que a diversidade de mecanismos de ação e de estrutura molecular dessas fitosubstâncias dificulta o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias, o que é otimizado pela especificidade e seletividade dessas substâncias para seus alvos celulares e da segurança para humanos (SHEN *et al*.,2015; XU *etal*.,2017; DE MORAIS OLIVEIRA- TININO *et al*.,2018; WANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.,* 2022).

Gomes *et al.* (2019) compararam o efeito antimicrobiano de extratos fenólicos de *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) e *Juglans regia* (Nogueira) com o da penicilina G separados e em conjunto contra 6 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina e uma cepa ATCC 25923. Inicialmente, as cepas foram testadas para penicilina G em que as cepas 1, 2 e 4 foram mais resistentes (24 µg/mL) e as cepas 3, 5 e 6, e ATCC 25923 foram menos resistentes (0,4 µg/mL), e posteriormente as cepas 1 e ATCC 25923 foram testadas para os extratos separadamente e juntos com o extrato fenólico de *E. globulu*s sob a concentração aproximada de 100 µg/mL e o de *J. regia* na concentração em torno de 195 µg/mL. Os autores observaram que não houve diferenças significativas no efeito antibacteriano, porém os extratos combinados com a penicilina G manifestaram um efeito bactericida muito melhor que o da penicilina administrada sozinha, de modo que mesmo que alguns fitoderivados não apresentam um excelente efeito quando administrados isoladamente ou em conjunto, no entanto, os mesmos podem ser excelentes adjuvantes dos antibióticos tradicionais.

Esse caráter adjuvante expresso por Gomes *et al*. (2019) foi anteriormente explorado por MAIA *et al.* (2018) que procurou avaliar a sinergia de fitosubstâncias bioativas com antibióticos contra *Streptococcus* spp. isolados de mastite bovina

ambiental. Especificamente as substâncias gut-A e 7-epi isolados de frutos de *Garcinia brasiliensis* (bacupari). Foram preparados em solução e testados junto a soluções de ampicilina, ceftriaxona, amoxicilina com clavulanato e gentamicina cuja sinergia foi mediada pelo método *Checkerboard* adaptado (REUK-NGAM *et al*., 2014) em que *S. agalactiae* foi resistente a solução de ampicilina e gentamicina e *S. uberis* resistiu também a solução de ceftriaxona e ambas foram sensíveis a amoxicilina com clavulanato. Os padrões de sensibilidade as soluções de gut-1 e 7-epi com ampicilina e gentamicina em oito combinações em que sete foram sinérgicas e uma foi aditiva, evidenciando o potencial adjuvante que produtos naturais podem ter tanto junto a antimicrobianos quanto junto a desinfetantes. Essa associação entre extratos vegetais diversos e assepsia foi também explorada por Gomes *et al.* (2019) e Schelles *et al*. (2021), usando extrato hidrometanólico de *E. globulus* e *J. peria* e extrato alcoólico de própolis, respectivamente.

Schelles *et al.* (2021) avaliaram o extrato alcoólico de própolis (oriundo das resinas e ceras de plantas) como agentes antissépticos pré- e pós-dipping em vacas leiteiras comparando com desinfetantes convencionais a base de iodo, e o que foi observado foi uma eficácia notável do extrato de própolis em reduzir a carga microbiana.

Alguns autores demonstraram o poder antimicrobiano de diversos fitoderivados como agentes antimicrobianos, adjuvantes e desinfetantes (SOARES, 2020), MACHADO, 2021, ZANETTI, 2022 e ALVES & MOREIRA, 2021). Os autores pontuaram que a busca por estratégias terapêuticas baseadas em fitosubstâncias e afins, além de promover inovação técnico-científica ao se apropriarem do conhecimento de propriedades farmacológicas da enorme diversidade de espécies vegetais brasileiras, que por vezes permanece oculta à Ciência Brasileira, se alinha ao conceito de Saúde Única (ONE HEALTH), ao integrar a saúde humana, animal e do ecossistema buscando mitigar os efeitos escalonados e intercorrentes entre essas três esferas de saúde e os problemas envolvendo mastite bovina, resistência a antimicrobianos, sanidade ambiental e segurança de alimentos. Curcio (2022) em sua revisão de literatura integrativa, apresenta extratos de diversas partes vegetais dos mais frequentemente estudados gêneros e espécies de plantas com comprovada atividade antimicrobiana contra bactérias relacionadas à mastite bovina e variados mecanismos de ação, de modo a mostrar estatisticamente a amplitude dos estudos investigando, comprovando e comparando o potencial antimicrobiano, asséptico e

farmacológico de fitoderivados, incluindo extratos de *Punica granatum* L., que é objeto de avaliação do presente estudo.

Pelo fato de *Punica granatum* L. (romã) ser um resíduo agrícola abundante, a investigação de sua utilização para pesquisa e aplicação em medicina veterinária se deve às vantagens que apresenta em relação a outros cultivares, como disponibilidade, praticidade de cultivo, baixo custo de manutenção, facilidade de extração e biodisponibilidade de fitomoléculas de interesse e aproveitamento quase integral de suas partes vegetais para fins nutricionais, fitoterápicos e cosmetológicos; ainda suas propriedades farmacológicas e composição fitoquímica abrangente possibilita a consideração de desenvolvimento de novos fitoterápicos (GUERRERO-SOLANO *et al*., 2020; DA SILVA MELO; DA CRUZ LUI, 2021).

As partes vegetais *P. grantum* têm diferentes concentrações de uma ampla variedade de compostos químicos naturais com funções biológicas igualmente variadas, sendo eles de fácil e simples extração e isolamento e presentes em praticamente toda a planta; com destaque para a polpa, casca e suco dos frutos (GUERRERO-SOLANO *et al*., 2020; DA SILVA MELO; DA CRUZ LUI, 2021).

Batista *et al*. (2020) investigaram as propriedades bioativas dos compostos do extrato de *P. granatum* e observaram propriedades curativas e cicatrizantes, atividade antibacteriana e antifúngica e ausência de citotoxicidade, permitindo uma amplitude de investigações para os mais diversos fins. Mostafa *et a*l. (2018), Konputtar *et al*. (2022) e Adil *et al*. (2024) compararam em seus respectivos trabalhos os efeitos e rendimento do extrato de *P. granatum* com os de outras plantas e observaram vantagens em relação a romã dentro do contexto de vários espécimes com propriedades semelhantes.

Estudos realizados no laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental demonstraram que o extrato etanólico da casca de *Punica granatum* teve atividade bactericida contra cepas ATCC de *E. coli, S. aureus, e S. agalactiae.* A análise cromatográfica do extrato etanólico de cascas do fruto de *P. granatum* demonstrou a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, sendo identificado a punicalagina o componente majoritário, com intensidade relativa do sinal de 100% (FREITAS *et al.*, 2020).

1.6.2. ***Punica granatum*** **L. no tratamento Mastite Bovina**

A espécie *Punica granatum* (Lythraceae) trata-se de uma planta nativa da Ásia, mais especificamente da região do Irã até o Himalaia no noroeste da Ásia, cultivada em todo o mundo, incluindo o Brasil (SANTOS *et al*., 2019). Tem grande relevância devido as suas propriedades farmacológicas e fitoterápicas, já que as flores, folhas, cascas do caule e da raiz, sementes, caules jovens e verdes, frutos e seus extratos e suco são usados na terapêutica (GUERRERO-SOLANO *et al*., 2020).

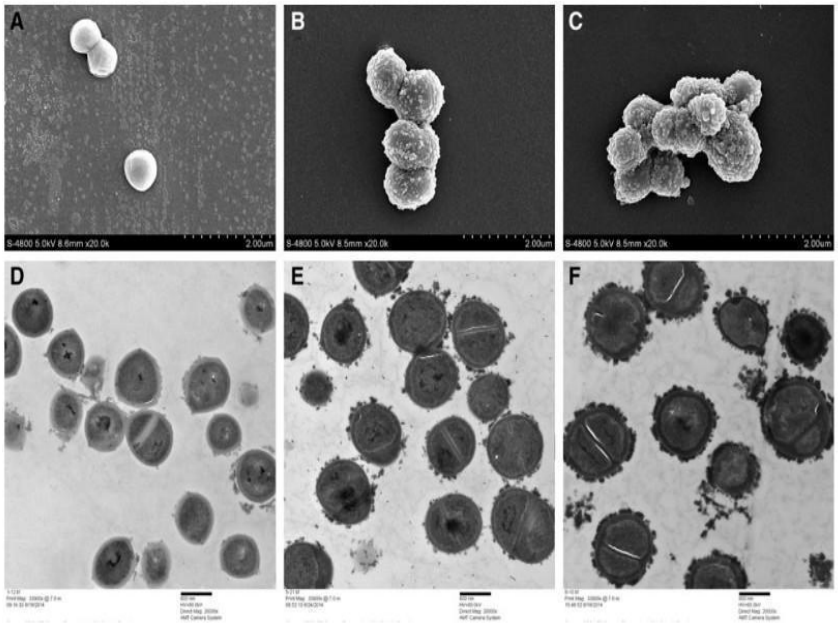
Apresenta como constituintes substâncias fenólicas, oriundas das vias do ácido chiquímico e fenilpropanóides, que possuem anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. Entre as principais substâncias fenólicas estão os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos. A punicalagina é um o tanino em maior abundância em frutos de *P. granatum*, em que as concentrações variam de acordo com o processo de extração (NODA *et al.*, 2020; SANTOS *et al*., 2019). Outros taninos presentes e abundantes na *P. granatum* são o ácido gálico e ácido elágico, ácido clorogênico e a punicalina.

Os flavonóides têm alto poder antioxidante e anti-inflamatório, devido a atividade inibitória de enzimas oxidantes ciclooxigenase e lipoxigenase, e dentre os flavonóides presentes em *P. granatum* verificou-se a apigenina, a naringenina e a antocianina.Além de taninos e flavonóides, foram identificados alcalóides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados e ácido ursólico e minerais como cálcio, ferro, fósforo (ZAREZADEH MEHRIZI *et al.,* 2017; BRIGHENTI *et al*., 2017; LANSKY, NEWMAN, 2007 apud SANTOS *et al*., 2019; JAM *et al*., 2022). Os principais ácidos fenólicos encontrados são o ácido salicílico, o ácido protocatéquico e o ácido gálico, podendo se apresentar em sua forma natural, ligados entre si ou ligados a outras substâncias (SANTOS *et al*., 2019)

Os taninos atuam na proteção vegetal contra patógenos por sua capacidade de inativar proteínas extracelulares e de precipitar proteínas do protoplasto e da membrana celular provocando perda do conteúdo citoplasmático. Os taninos são divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados; a punicalagina é um tanino elágico hidrolisável encontrado nas formas anoméricas α e β - uma das mais relevantes fitosubstância por seu caráter anti-inflamatório, anti-proliferativo e antioxidante (OUDANE *et al*., 2018; KHARCHOUFI*et al*., 2018; LANSKY, NEWMAN, 2007 apud SANTOS *et al*., 2019; SINGH *et al.,* 2019; VENUSOVA *et al*., 2021).

Punica granatum L., popularmente conhecida como romã no Brasil, tem atividade antimicrobiana bactericida e bacteriostática contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas, cuja ação específica se estende também a formação de biofilmes, interferindo na síntese de poliglicanos, o que culmina no impedimento da aderência bacteriana a superfícies (PEREIRA *et al*., 2006 apud SANTOS *et al.,* 2019). A atividade antimicrobiana de romã se deve em grande parte aos taninos, alcalóides, e flavonóides - em especial pelas altas concentrações de taninos e flavonóides sendo os responsáveis pelo rompimento da parede celular bacteriana, inibição enzimática e ainda redução de polissacarídeos e proteínas de biofilme. As substâncias fenólicas em conjunto atenuam fatores heterogêneos de modulação de resposta inflamatória, e têm atividades antitumor, antidiabética, antihipertensiva e cardioprotetora em que essas substâncias têm efeito sinérgico entre si sob diversos microrganismos (FAWOLE *et al.,* 2012; WONG *et al.,* 2018; LANKSV, NEWMAN, 2007; SANTOS *et al*., 2019; MELAK MAHDAVI *et al.,* 2021; SHAIKH, BHANDARY, 2021). O efeito sinérgico das fitosubstâncias de *P. granatum* se dá tanto considerando as substâncias purificadas da própria espécie quanto de extratos de outras plantas levando a uma otimização mútua dos efeitos sobre os microrganismos (JAM *et al*., 2022). Jam *et al.* (2022) combinaram os extratos de romã com os de noz de areca (*Areca nut*) e testaram seu efeito antimicrobiano para bactérias envolvidas em intoxicação alimentar, incluindo *S. aureus* e *E. coli,* com intuito de determinar a concentração mínima inibitória (CMI). Os extratos metanólicos e etanólicos de ambas as plantas foram eficientes contra *S. aureus,* enquanto apenas os extratos etanólicos foram eficientes para *E. coli.* Os resultados mostraram que a combinação de extratos é uma alternativa válida, assim como o uso isolado de cada um e/ou de suas frações, pela otimização do poder de penetração e efeito inibitório de resistência em células individuais e dentro de biofilmes (BHAT, 2016; WANG *et al*., 2018. GUERRERO-SOLANO *et al*., 2020). Confirmando o potencial adjuvante das fitosubstância presentes no extrato de romã, Xu *et al.* (2017) observaram que a punicalagina causou alterações irreparáveis a membrana celular de *S. aureus* (Figura 14) no período de 4 horas e inibiu a formação de biofilmes, tanto de um novo biofilme como de biofilmes já estabelecidos, de modo que se pode também considerar seu uso como agente antisséptico e antimicrobiano simultaneamente.

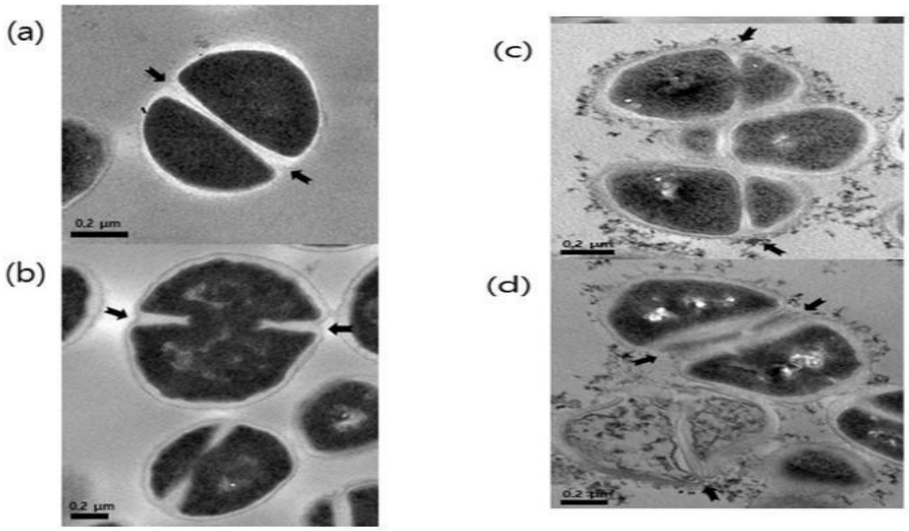
Figura 14- Efeito da punicalagina sobre células de *S. aureus* em 4 horas de tratamento.



Fonte. Xu *et al*. (2017).

Além da otimização da ação de extratos vegetais, as fitosubstâncias da romã também podem atuar como antibióticos convencionais, verificado no estudo de Mun *et al.* (2018), em que o efeito da punicalagina no período de 10 horas (Figura 15) sobre *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, em inglês) levou a alterações significativas nas células de *S. aureus*. Os autores demonstraram a reversão da resistência a oxacilina aumentando a susceptibilidade a este antibiótico por meio da inibição das enzimas hidrolíticas e da biossíntese de parede celular bacteriana. Os autores sugerem que o efeito da punicalagina parece exercer sobre a bactéria, otimiza a ação do antibiótico em penetrar no interior da célula sem interferência de enzimas degradadoras, e tal capacidade pode auxiliar, por exemplo, na reversão de resistência a antimicrobianos *β*-lactâmicos, uma das classes mais utilizadas no tratamento de mastite bovina e que apresenta crescente resistência por parte dos patógenos envolvidos.

Figura 15- - Efeito da punicalagina no período de 10 horas sobre *S. aureus.*



Fonte: Mun *et al,* 2018.

Moreira *et al.* (2014) avaliaram o extrato hidroalcoólico a 10% da casca de romã contra *Staphylococcus* spp. isoladas de leite bovino, em que 30 g do material vegetal foi diluído e, 190 mL de álcool P.A. e 80 mL de água destilada e as cepas usadas foram cepas de isoladas de casos de mastite e *S. aureus* ATCC 25923 a escola 6 de McFarland por técnica de difusão de disco, em que se observou efeito sobre *Staphylococcus* tanto coagulase negativos quando coagulase positivos, e principalmente sobre isolados identificados como *S. aureus*, os autores do trabalho comparam seus resultados com os obtidos por Moreira *et al.* (2014) que avaliaram os extratos aquoso, seco e *in natura* e obtiveram resultados semelhantes para *S. aureus* com o extrato seco. Manasathien *et al*., 2012 apud Moreira *et al.* (2014) avaliaram os extratos etanólico e aquoso, Moreira *et al*. (2014) extratos etanólicos e metabólicos, respectivamente. Esses estudos demonstraram que esta planta e o extrato de sua casca, têm potencial antimicrobiano, farmacológico e antisséptico avaliados sob diferentes perspectivas, usando-se de diferentes metodologias e em comparação com extratos de outras plantas e antibióticos.

Martins & Casali (2019) confirmaram os efeitos do extrato etanólico da casca do caule, fruto e folhas de *P. granatum*, de modo a corroborar com demais trabalhos como Campos *et al*. (2021) que avaliaram o extrato da casca de romã, frações do extrato e punicalagina isolada frente a cepas *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e coagulase positivas isoladas de vaca com mastite, sendo o extrato da casca obtido por maceração e percolação, as frações por fracionamento líquido-líquido e a

purificação da punicalagina por cromatografia. Os resultados obtidos foram promissores para a atividade da punicalagina contra *S. aureus*, sendo uma fitosubstância relevante na ação do extrato junto a outros taninos e flavonoides. Constituintes da casca de romã podem ser estudados para pesquisas farmacêuticas como alternativas na prevenção, no controle e no tratamento de mastite.

Estudos anteriores, em nosso laboratório, realizados por Freitas *et al.* (2020) demonstraram a atividade bactericida do extrato hidroalcoólico da casca de *P. granatum,* rico em punicalagina, contra bactérias mais frequentes associadas à mastite bovina em crescimento planctônico. Foi observada uma redução do crescimento bacteriano superior a 90% quando as suspensões bacterianas de *E. coli, S. aureus e S. agalactiae* foram tratadas com as concentrações de 37,5 e 18,5 mg/mL de extrato hidroalcoólico da casca de *P. granatum* por 1, 3 e 6 horas. Nossos dados demonstraram que a ação do extrato na célula bacteriana parece estar diretamente relacionada à perda de integridade da membrana, tendo em vista os ensaios da incorporação de Iodeto de propídeo por citometria de fluxo. Esses resultados nos levam a especular a possível utilização na formulação de um produto sanitizante para uso pré e pós ordenha.

Levando em conta todo o contexto em que a *P. granatum* L. mostra atividade antimicrobioana contra espécies comumente associadas a mastite bovina, o presente trabalho tem por finalidade averiguar o potencial do extrato de sua casca sob a perspectiva comparativa entre diferentes concentrações do extrato paralelas a desinfetantes comumente utilizados e a fim de se obter dados que possam apresentar e corroborar a possibilidade de utilização do extrato como sanitizante ou adjuvante de sanitizantes de alta eficiência dentro de curtos intervalos de tempo e capazes de sobrepor a resistência a antimicrobianos por parte das cepas bacterianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o mecanismo de ação bactericida do extrato etanólico dos frutos de *Punica granatum* contra bactérias frequentemente associadas à mastite bovina ambiental e contagiosa.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade bactericida do extrato etanólico da casca de romã contra cepas ATCC associadas à mastite bovina ambiental e contagiosa (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus,* respectivamente) em curtos períodos de tempo: 30, 60 e 120 segundos.
2. Comparar a eficácia do extrato de *P. granatum* com os desinfetantes comumente usados na Mastite Bovina por citometria de fluxo;
3. Analisar o efeito do extrato de *P. granatum* na estrutura da célula bacteriana por microscopia eletônica de varredura e de transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

As espécies bacterianas associadas à mastite bovina utilizadas foram gentilmente cedidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária- CMRVS, FIOCRUZ- INCQS, Rio de Janeiro, RJ.

1. *Escherichia coli* INCQS (00219) - ATCC (8739)
2. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* INCQS (00039)- ATCC (6538).

3.2 Preparo das suspensões bacterianas

Foram semeados 25 µL de culturas em estoque em 3 mL de meio Luria Bertanni (LB). Após a semeados, foram homogeneizados em agitador orbital, a 150 rpm, a 33ºC por 16 a 18 horas após a homogeneização, os tubos foram centrifugados a 4.500 rpm por 10 minutos a 4ºC, os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* formado homogeneizado em vórtex. As diluições foram realizadas em *Müeller Hilton* II (MHII) a partir do *pellet* bacteriano em fotocolorímetro (Biochrom) na densidade ótica a 680_{nm} a fim de obter suspensões bacterianas com densidade óptica de 0,13, que correspondem a 1,0 x 10^8 UFC/mL. A partir desta concentração, foram realizadas diluições 1/1000 para atingir concentração de 1,0 x 10^5UFC/mL e posteriormente diluição 1/1000 para atingir concentração final de 1,0 x 10^2UFC/mL, para utilização nos ensaios de citometria e determinação das Unidades Formadoras de Colônias/mL.

3.3 Preparo do Extrato de *Punica granatum*

A coleta foi feita no Sítio Boa Vista em Taquaritinga (21º 24`6``S 48º 27`8``O), São Paulo, Brasil. Por meio da análise morfológica de ramos, flores e frutos, a espécie da romã foi determinada (*Punica granatum* L.). As exsicatas foram depositadas (HUNI 6241) no Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta – HUNI (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO).

O preparo do extrato foi realizado no laboratório didático e pesquisa de Bioquímica aos cuidados do Prof. João Bosco de Salles. Os frutos foram lavados com detergente e devidamente secos. Em seguida os frutos foram descascados, sendo a

polpa e as sementes descartadas. As cascas foram conservadas em freezer a -20ºC até o uso.

Para o preparo do extrato, as cascas foram liofilizadas por 24 horas e, em seguida, trituradas em moinho de pá (IKA A11 Basic) até virarem pó. Para a extração hidroalcoólica, 100 g de pó de casca de romã foram misturados a 1000 mL de uma solução etanólica 90% (v/v). Essa mistura foi submetida à maceração por 10 dias, com agitação diária, sendo mantida em local seco sob abrigo de luz. O extrato foi filtrado com funil de Büchner e o etanol evaporado até a secura, sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 45ºC. O extrato seco obtido foi armazenado em recipientes esterilizados secos, a 4°C, até o uso. O rendimento foi de 252 g de extrato seco a partir de 500 g de cascas de romãs liofilizadas.

3.4 Análise fitoquímica do Extrato de *Punica granatum*

Os espectros de massas foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster no Laboratório de Química Forense da Universidade Federal Espírito Santo).

Uma etapa anterior a Espectrometria de massas foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, em inglês), que foi realizada também para os experimentos de Freitas *et al*. (2020), que utilizou-se do mesmo extrato em sua pesquisa, sendo o mesmo perfil cromatográfico observado e descrito.

O extrato etanólicos de *P. granatum* foram analisados utilizando a técnica analítica Espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier com fonte de ionização por eletrospray no modo negativo (ESI(-)-FT-ICR MS), Solarix XR 7T (Bruker). As amostras foram solubilizadas em solução água:acetonitrila (1:1, v/v) e diluídas para concentração de 1 mg/mL em solução de água:acetonitrila 1:1 (v/v) contendo 0,1% NH_4OH para análise no modo negativo em uma faixa de massa de m/z 75-1200 m/z. As condições de origem do ESI foram as seguintes: pressão de gás do nebulizador de 1,0 bar, tensão capilar de 3-3,5 kV e transferência de temperatura capilar de 25ºC. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o software de análise de dados Compass pacote (Bruker)

3.5 Estudo *in vitro* da alteração da integridade das membranas das cepas *S.aureus* e *E. coli* tratadas com extrato *P. granatum* por citometria de fluxo.

Os ensaios para avaliar a integridade das membranas foram realizados através de citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo, um intercalante de DNA, que é um marcador de alteração de permeabilidade de membrana. Para tal, suspensões bacterianas com densidade de 10^2 UFC/mL foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato (50 mg/mL, 25 mg/mL e 10mg/mL) de *P. granatum* no tempo de 30, 60 e 120 segundos, considerando que esse é o tempo de secagem de sanitizantes com os quais o extrato será comparado . Após, as suspensões bacterianas foram submetidas à citometria de fluxo onde 20.000 células foram analisadas pelo BD FACScaliburTM Flow Cytometer. As análises dos dados foram realizadas no software Cellquest versão 6.0. A densidade de 10^2 UFC/mL estabelecida para o ensaio de citometria de fluxo foi mantido como parâmetro para os demais ensaios realizados.

3.6 Quantificação do DNA no sobrenadante das culturas das cepas bacterianas após o tratamento com o extrato de *P. granatum*

As diluições do pellet bacteriano de *S.aureus* e *E.coli* foram realizadas conforme o item 4.3 até a obtenção das suspensões bacterianas de 10^2 UFC/mL. Quando obtidas, foram adicionados 1 mL da suspensão em microtubos e feito a interação com o extrato de *P. granatum* por 30 segundos, nas concentrações 50 mg/mL, 25 mg/mL e 10mg/mL. Os controles não tratados foram incubados por 30 segundos à temperatura ambiente junto com os ensaios. Após o tempo, as amostras foram centrifugadas por 4.500 rpm a 4º C por 10 minutos e foram colhidos os sobrenadantes.

A extração do DNA no sobrenadante foi feita pelo kit FastDNA spin for soil typical workflow. A partir dos sobrenadantes das nossas amostras, foram adicionados 250µl de PBS, homogeneizado 10 vezes e os eppendorfs levados ao freezer por 5 minutos para que a baixa temperatura favorecesse a precipitação das proteínas. Após o período, foram centrifugados por 14.000g por 5 minutos. As amostras centrifugadas foram passadas para um tubo falcon de 15 mL e adicionados 1mL do Binding Matrix Solution, os tubos foram homogeneizados por inversão durante 2 minutos e 3 minutos

em descanso. Essa solução foi transferida para um tubo com filtro com volume máximo de 600µl e centrifugado a 14.000g por 1 minuto, esse processo foi repetido até o final da amostra. Para a lavagem do filtro foram adicionados 500µl do reagente SEWS-M e centrifugado por 14.000 g durante 1 minuto . O tubo foi centrifugado novamente para que pudesse secar e ficou em temperatura ambiente por 5 minutos. Na etapa final foram adicionados 100µl da solução DES e centrifugado a 14.000g por 1 minuto e assim obtendo as amostras.

A leitura da quantificação do DNA foi feita pelo espectrofotômetro NanoDrop 200

3.7 Avaliação das alterações morfológicas das cepas bacterianas após tratamento de *P. granatum*

Foram realizadas diluições do *pellet* bacteriano de *E. coli* e *S. aureus* conforme descrito no item 4.3 até a obtenção das suspensões bacterianas com DO_{680nm}=0.2. Foram adicionados 1mL da suspensão a DO_{680nm}=0.2 a eppendorfs. Quando então, foi adicionado o extrato de *P. granatum* a partir da solução estoque de forma que as suspensões das cepas *E. coli* e *S. aureus* foram tratadas por 30 segundos com 10mg/mL de extrato. Os controles não foram tratados e incubados por 30 segundos a temperatura ambiente junto com as outras amostras. Após o período de tempo as amostras foram centrifugadas a 4.500 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram retirados e os pellets ressuspensos em 500µl de tampão de Karnovsky (Paraformaldeído 4% + Glutaraldeído 2,5%) para fixaçãoe processados paramicroscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

3.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para MEV foi realizada segundo Pereira *et al*., 2023, os pellets bacterianos após a fixação foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após nova lavagem, o material foi desidratado em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90% e 2 vezes em álcool absoluto), 30 minutos cada etapa. O material foi levado ao ponto crítico dispositivo para substituição de etanol por CO_2, posteriormente fixado em stubs com fita de carbono e metalizado com ouro. Após a metalização, o material foi

analisado utilizando o microscópio eletrônico JEOL-JSM-6390-LV (JEOL, Akishima, Tóquio, Japão).

3.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O preparo das amostras para o MET foi realizado segundo De Andrade Soares *et al.* (2023), os pellets foram pós-fixados em 1% tetróxido de ósmio. As amostras foram desidratadas através de uma série graguada de acetona e incorporadas em resina Epon 812. Cortes ultrafinos (70nm) foram feitos com Leica Ultracut Ultramicrótomo UCT, coletado em grades de cobre e corado com 5% de acetado de uranila e citrato de chumbo. As seções foram examinadas com um microscópio eletrônico JEM1200EX (JEOL, São Paulo, São Paulo, Brasil) em 80Kv.

3.9 Determinação da sobrevida bacteriana após tratamento com as diferentes concentrações de extrato e desinfetantes.

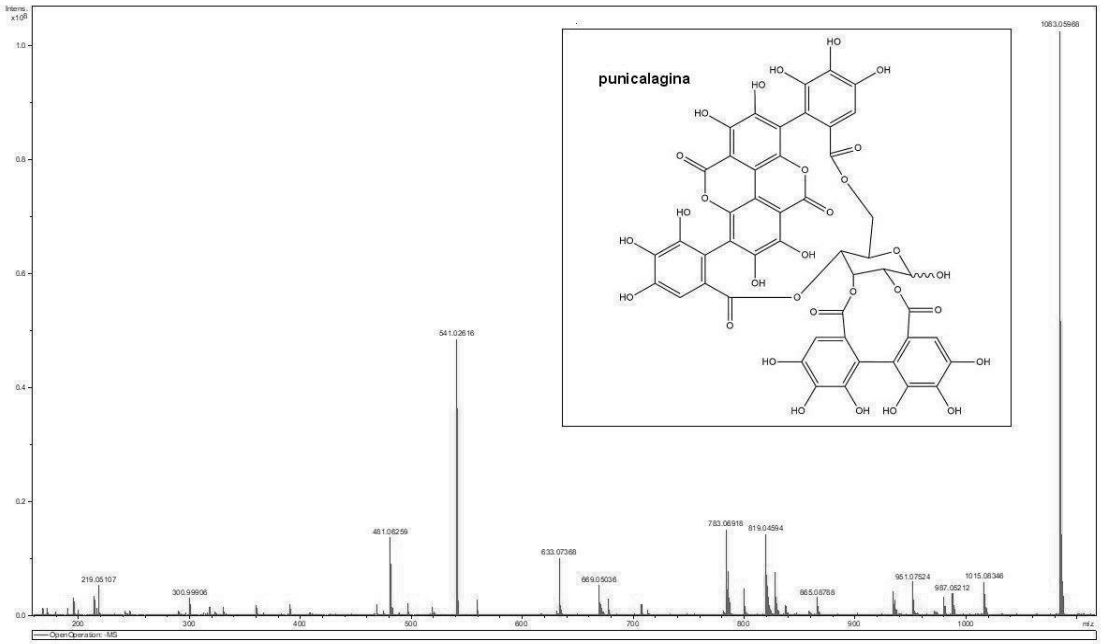
Para a determinação das Unidades Formadoras de Colônias/mililitro (UFC/mL), foi utilizada a metodologia da macrodiluição em caldo (Eucast, 2024). Para tal, suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* com densidades em torno de 10^2 UFC/mL foram submetidas ao tratamento por 30 segundos com as diferentes concentrações do extrato de *P. granatum* (50 mg/mL, 25 mg/mL e 10 mg/mL), cloro (2,5% e 0,5%) e Clorexidina (2,0% e 0,5%). Para determinação UFC/mL foram adicionados 180 µl de solução salina em 9 poços de uma placa de 96 poços e 20 µl das culturas bacterianas tratadas pelas diferentes concentrações de extrato e desinfetantes no primeiro poço. Foram realizadas diluições sucessivas, transferindo 20µl, de modo a obter uma diluição 10^{-1}a 10^{-9}. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 10 µl de cada diluição, em triplicata, colocadas em placas de Petri contendo meio agar Muller Hinton. As placas foram incubadas por 24 h a 35±2ºC. Após este período, foi realizada a contagem das colônias.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Fitoquímica do Extrato Hidroalcoólico de *P. granatum.*

A análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico da casca de romã indicou como substâncias majoritárias os taninos hidrolisáveis, elagitaninos punicalaginas (α e β), conforme íon 541.03243 m/z (Figura 16). Também foram encontrados ácidos elágicos formados pela hidrólise dos elagitaninos.

Figura 16- Estrutura química da punicalagina, tanino hidrolisável encontrado no extrato hidroalcoólico de casca de romã.



Fonte: Acervo próprio

4.2 Estudo *in vitro* da viabilidade de cepas bacterianas (*E. coli* e *S.aureus*) tratadas com extrato de *P. granatum* por citometria de fluxo.

A análise da integridade da membrana bacteriana após contato com o extrato foi avaliada por citometria em diferentes tempos (30, 60 e 120 segundos) utilizando o parâmetro de intensidade de fluorescência (FL 3) após tratamento com iodeto de propídeo, um intercalante de DNA.

Os resultados preliminares referentes as cepas de *S. aureus* e *E.coli* estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Foram observados maiores que 100% de intensidade de fluorescência em FL3 após o tratamento com as diferentes

concentrações do extrato utilizado em todos os períodos de tempo quando as medianas de intensidade de fluorescência foram comparadas com os controles não tratados.

Esses dados sugerem alterações na integridade das membranas das células bacterianas das duas cepas. Os aumentos das medianas de intensidade podem ser melhores evidenciados nas Figuras 17 A e B que representam as sobreposições das medianas de intensidade de fluorescência após o tratamento com as diferentes concentrações por 30 segundos de *E.coli e S. aureus* comparadas ao controle não tratado.

Tabela 1- Análise da alteração da permeabilidade de membrana pela incorporação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo após tratamento das suspensões de *E. coli* com o extrato de *P. granatum*.

Tempo (segundos)	**Controle (1°Q/3°Q)**	**50mg/mL (1°Q/3°Q)**	**25mg/mL (1°Q/3°Q)**	**10mg/mL (1°Q/3°Q)**
30	13,1 (12,4/20,9)	214,8 ‘(167,0/235,0)	201,7 (118,8/239,3)	91,4 (87,8/179,4)
60	18,6 (13,3/22,3)	197,7 (126,4/269,0)	189,4 (86,0/239,0)	111,4 (61,0/118,6)
120	18,5 (13,0/22,5)	218,7 (100,9/250,3)	181,1 (67,9/245,8)	118,6 (82,0/129,8)

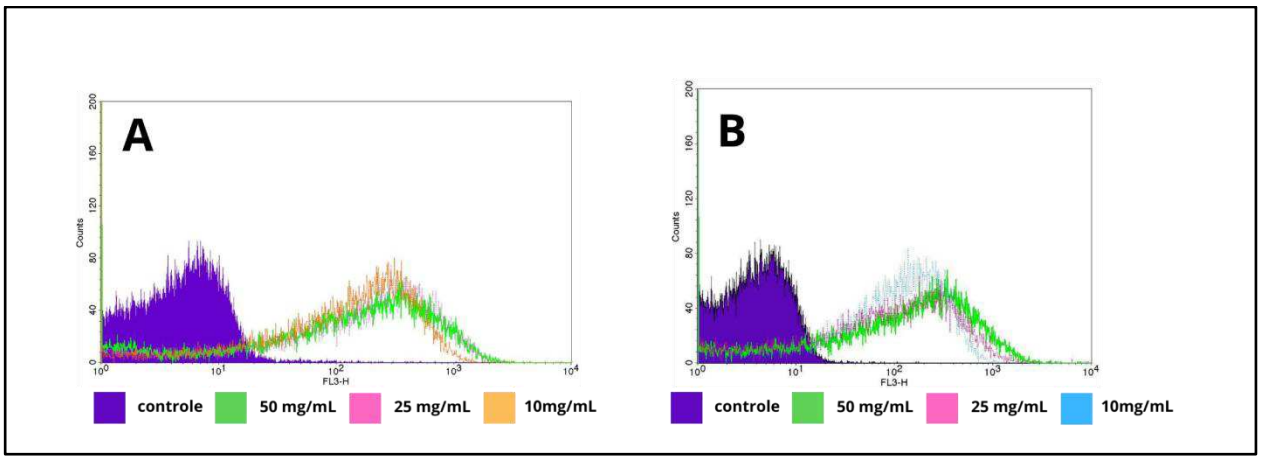
Os dados representam mediana (1°Quartil/3°Quartil) de três experimentos onde 20.000 células foram analisadas por citometria de fluxo

Tabela 2- Alteração da permeabilidade de membrana de pela incorporação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo após tratamento das suspensões de *S.aureus* com o extrato de *P. granatum*.

Tempo (segundos)	Controle (1°Q/3°Q)	50mg/mL (1°Q/3°Q)	25mg/mL (1°Q/3°Q)	10mg/mL (1°Q/3°Q)
30	12,6 (11,6/24,9)	179,4 (164,0/198,1)	138,9 (129,8/283,9)	129,8 (63,8/189,4)
60	12,5 (12,1/14,5)	191,1 (120,8/212,9)	115,5 (79,8/177,4)	121,9 (107,5/220,7)
120	13,5 (11,6/41,4)	196,3 (148,6/199,9)	64,36 (50,5/160,9)	82,79 (77,0/259,5)

Os dados representam medianas (1º Quartil/3º Quartil) de três experimentos onde 20.000 células foram analisadas por citometria de fluxo.

Figura 17- Sobreposição das medianas de intensidade de fluorescência (FL3) após a incorporação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo após tratamento das suspensões de E. coli (A) e S.aureus (B) com as diferentes concentrações de extrato de P. granatum.



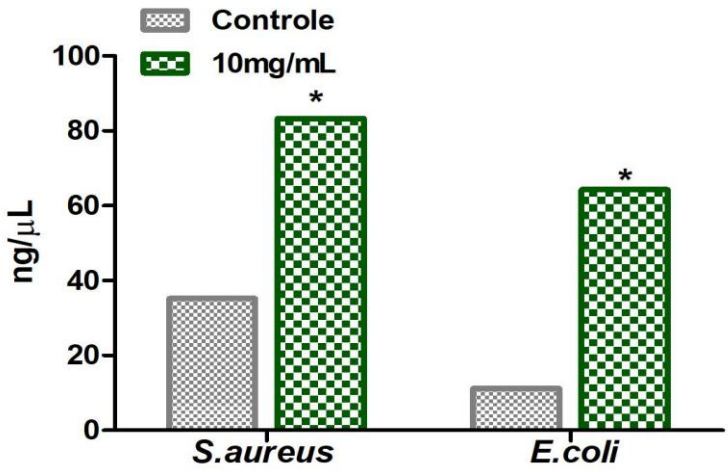
4.3 Quantificação do DNA no sobrenadante das cepas bacterianas após o tratamento com o extrato de *P. granatum*.

Considerando os resultados da análise da impregnação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo que sugeriu danos na integridade das membranas

celulares com aumento em torno de 100% na menor concentração utilizada (10mg/mL), foi avaliado a concentração de DNA nos sobrenadantes das suspensões bacterianas de *E.coli* e *S.aureus* após tratamento com 10 mg/mL do extrato de *P. granatum* por 30 segundos.

A Figura 18 mostra as concentrações de DNA nos sobrenadantes das culturas e corroboram os resultados da citometria de fluxo. Ocorreu aumento significativo da concentração ($p<0,05$) de DNA nos sobrenadantes das culturas de *S.aureus* (83,25 ng/L) e *E.col i*(64,25 ng/mL) tratadas com o extrato quando comparadas com o controle (35,20 ng/mL e 11,20 ng/mL, respectivamente) não tratado.

Figura 18- Concentração de DNA (ng/mL) nas culturas bacterianas tratadas com extrato etanólico.



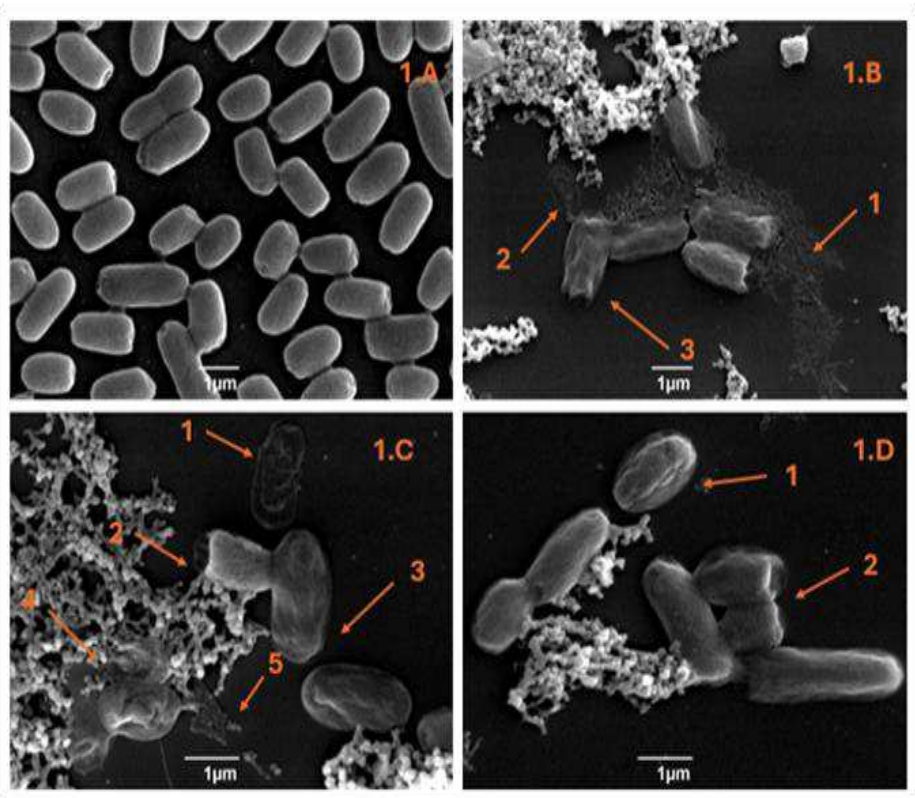
. Os dados representam as medianas de um experimento cuja leitura foi realizada em triplicata . * $p< 0,05$ quando os dados das amostras tratadas com *P.granatum* foram comparadas com as não tratadas.

4.4 Avaliação das alterações celulares ultraestruturais das cepas *E.coli* e *S.aureus* por MEV e MET.

Com o intuito de validar os resultados da integridade de membrana das cepas em contato com o extrato de *P. granatum* feito por citometria de fluxo e quantificação do DNA no sobrenadante foi realizada a análise ultraestrutural das suspensões bacterianas após tratamento com o extrato por MEV.

Os resultados MEV mostraram alterações de superfície das células bacterianas de *E.coli* em contato com 10 mg/mL do extrato por 30 segundos quando comparadas com o controle não tratado . As figuras 19A e 19B mostraram rupturas nas membranas, extravasamento dos conteúdos intracelulares e perda do conteúdo citoplasmático, dando aquele aspecto de saco vazio às células de *E.coli* e *S.aureus*, respectivamente.

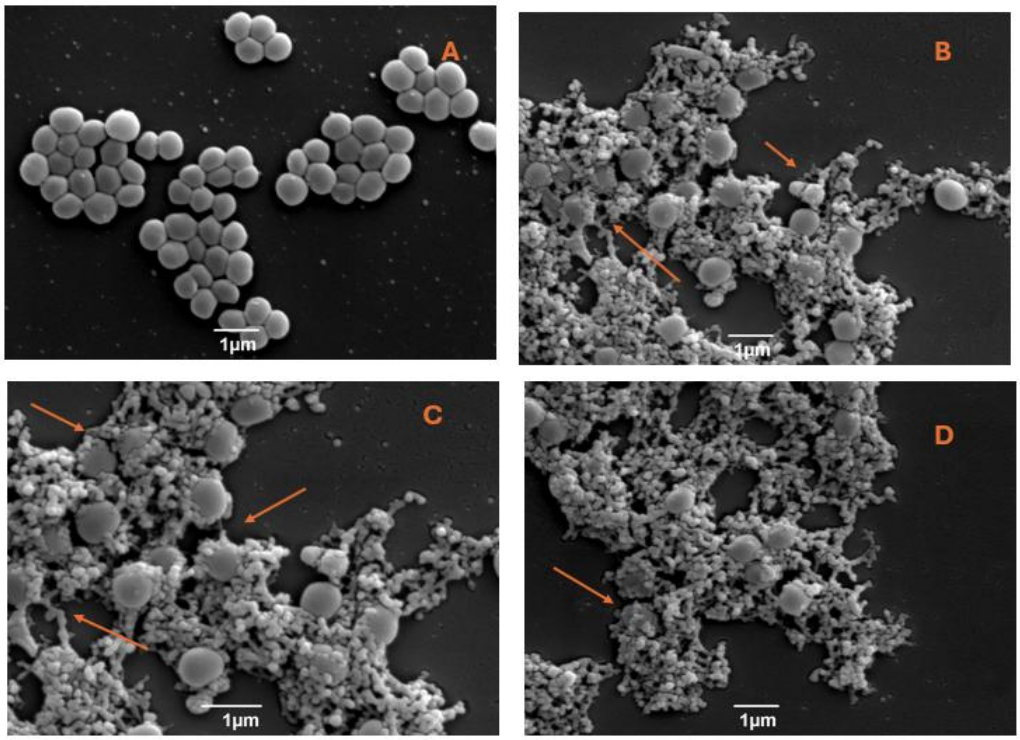
Figura 19- Microscopia Eletrônica de Varreduda de E. coli depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml



Pode se perceber nas imagens os efeitos mais drásticos do extrato como a ruptura de membrana e extravasamento do conteúdo celular (1B.1, 1B.2,1C.5 1D.1) e alteração no tamanho e formato (1C.3), quando comparadas com a imagem do controle, A.

.

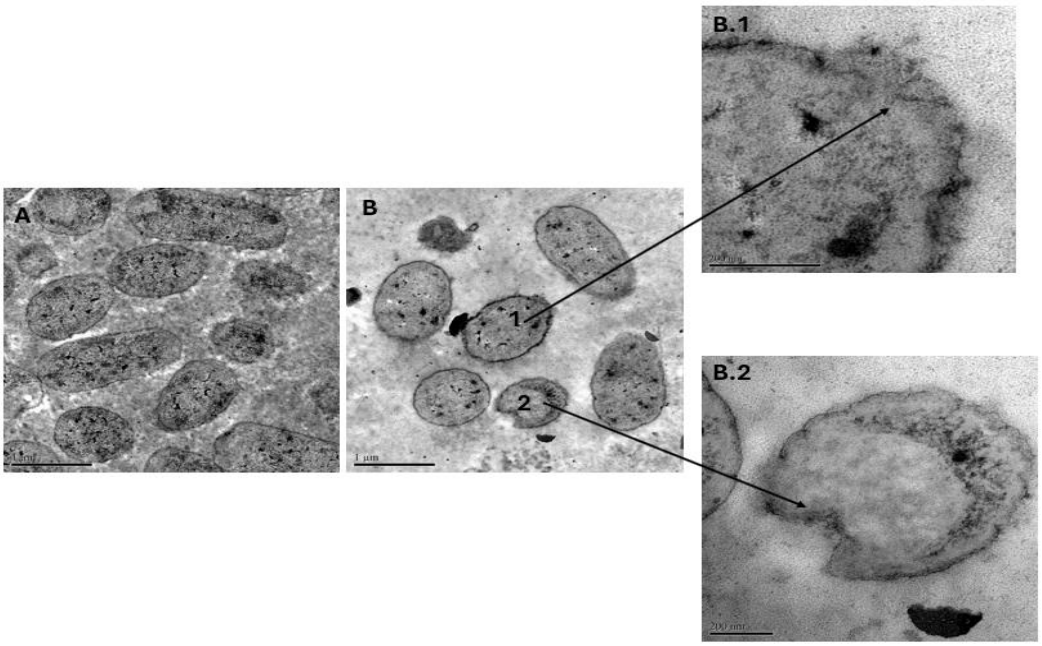
Figura 20- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de S. aureus depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml



A imagem A, suspensão controle, não tratada, não apresenta alterações de superfície. As imagens B, C e D foram obtidas após tratamentos e apresentam as seguintes alterações: Restos celulares e diminuição de tamanho. (B). Além das alterações mencionadas podemos perceber extravasamento do conteúdo celular (C) .A diminuição no tamanho da célula causado pelo rompimento da membrana e perda de conteúdo celular, a formação de agregados e poucas células bacterianas íntegras.(D).

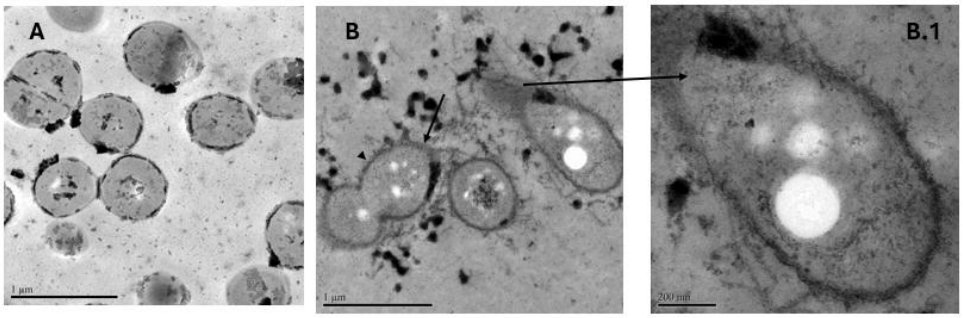
Os resultados das análises morfológicas de estruturas celulares por microscopia eletrônica de transmissão mostraram melhor os danos na membrana celular e o extravasamento do conteúdo intracelular. As figuras 20 e 21 mostraram rupturas nas membranas, extravasamento dos conteúdos intracelulares e perda do conteúdo citoplasmático de *E.coli* e *S.aureus*, respectivamente.

Figura 21- Microscopia Eletrônica de Transmissão das suspensões de E. coli depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml



A. suspensão não tratada com extrato (controle); B. Suspensões tratadas com o extrato. As setas evidenciam as alterações. B.1) ruptura de membrana; B.2) extravasamento do conteúdo citoplasmático. Fonte : Autoria própria

Figura 22- Microscopia Eletrônica de Transmissão das suspensões de S.aureus depois de 30 segundos em contato com 10 mg/ml do extrato etanólico de P. granatum 10 µg/ml



A imagem A representa a suspensão não tratada com extrato (controle); B. e B.1 Observamos as suspensões tratadas com o extrato. As setas evidenciam ruptura de membrana e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Fonte : Autoria própria

4.5 Determinação da sobrevida bacteriana após tratamento com as diferentes concentrações de extrato e desinfetantes.

Os dados da Tabela 3 representam a sobrevida de *S.aureus* e *E.coli* após o tratamento com as diferentes concentrações do extrato de *P.granatum* (50mg/mL, 25mg/mL e 10mg/mL) e os desinfetantes cloro (2,5% e 0,5%) e Clorexidina (2,0% e 0,5%) por 30 segundos determinados por macrodiluição em caldo.

Foi observado no tratamento com as diferentes concentrações do extrato que as concentrações de 50 mg/mL e 25 mg/mL foram bactericidas em 30 segundos contra as cepas *E.coli* e *S.aureus*. A concentração de 10 mg/mL, não teve atividade bactericida contra *E.coli* reduzindo a massa bacteriana em 79,4%.

A clorexidina foi eficiente nas duas concentrações testadas para as duas cepas, no entanto, o cloro na concentração de 0,5% não teve efeito bactericida no tempo de 30 segundos nas culturas de *S.aureus* e apenas reduziu a massa bacteriana em 88,9% nas suspensões de *E.coli.*

Tabela 3- Determinação das Unidades Formadoras de Colônias /mL (UFC/mL) das suspensões de *S.aureus* e *E.coli* após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *P. granatum* e desinfetantes.

Espécies bacterianas	**Controle**	***P. granatum***			**Clorexidina**		**Cloro**	
	(Não tratado)	**50 mg/mL**	**25 mg/mL**	**10 mg/mL**	**2%**	**0,5%**	**2,5%**	**0,5%**
S.aureus	**1,0 x10²** (1,0/1,7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	**1,3 x 10²** (1,0/1,6)
E.coli	**6,3 x 10²** (4,6/8,5)	0,0	0,0	**1,3 x 10²** (0/1,3)	0,0	0,0	0,0	**0,7 x 10² (0,3/1,3)**

Os dados representam medianas (1º Quartil/3ºQuartil) de dos experimentos realizados em triplicata.

5 DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é um grande problema de saúde global e representa uma ameaça à saúde, alimentação e segurança, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). A busca por produtos vegetais como agentes antimicrobianos tem aumentado devido ao surgimento de resistência aos antibióticos e desinfetantes convencionais, bem como o alto custo desenvolvimento de novas moléculas sintéticas. Plantas com propriedades antimicrobianas comprovadas estão sendo direcionadas para o desenvolvimento de novos medicamentos e sanitizantes que possam vencer a resistência microbiana e sejam economicamente viáveis, apresentando resultados promissores. Entre os sanitizantes naturais utilizados no tratamento da mastite bovina estão óleos essenciais, óleos vegetais, extratos, bacteriocinas e fitoderivados são uma alternativa viável e eficiente devido à complexidade das estruturas dessas substâncias que escapam das adaptações bacterianas (MOHAMMADI *et al*.,2023; SILVA *et al*.,2024).

Resultados anteriores em nosso laboratório demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* possui atividade bactericida contra bactérias associadas à mastite bovina (*E. coli, S. aureus* and *S. agalactiae*) com apenas 1 hora de contato com o extrato (FREITAS *et al*., 2020). O que nos levou a especular o uso do extrato como sanitizante, portanto esse trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito do extrato hidroalcóolico de *P. granatum* nas membranas celulares de *E.coli* e *S.aureus* em períodos de tempo de contato utilizados comumente pelos sanitizantes convencionais.

Para a realização desse estudo, foi feita nova coleta de frutos de *P.granatum*, que foram obtidos em uma fazenda em São Paulo para a produção de novo lote de extrato. Inicialmente, realizamos nova análise fitoquímica a fim de assegurar que o extrato possui o mesmo perfil fitoquimico do anteriormente utilizado, visto que as diferenças entre o solo, clima, temperatura e região podem influenciar na quantidade das substâncias bioativas dos extratos.

No presente trabalho, assim como em Freitas *et al.* (2020), o extrato foi submetido a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para identificação dos fitoconstituintes. Os resultados corroboram com os achados anteriormente por Freitas *et al*., 2020 e aos demais trabalhos que descreveram o potencial antimicrobiano do extrato de casca de romã, os maiores picos cromatográficos indicaram a abundância de punicalaginas, ácido elágico e ácido gálico sendo estas as substâncias majoritárias do extrato, seguidos por demais

constituintes como pecundulaginas I e II, taninos e granatina (ALMEIDA, 2020; GOSSET-ERARD *et al*., 2021; DE SOUZA SALTANUN *et al*., 2021; RAFEY *et al*., 2021;RODRIGUES, *et al*., 2023; SANCHES, *et al*., 2023; NUNES, 2023).

A casca de *P. granatum* é um resíduo vegetal abundantemente produzido no Brasil, é rico em substâncias fenólicas e metabólitos secundários e é utilizada para o tratamento de acne, mastite, dermatite e infecções em órgãos reprodutores femininos e masculinos (SOUSA *et al*, 2018). A punicalagina éo tanino predominante presente na casca da romã e vem sendo muito estudada devido às suas atividades antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas (KIRAN *et al.*, 2024).

Isômeros de punicalagina, ácido gálico e ácido elágico são identificados frequentemente em extratos de casca de romã como nos estudos de Shahkoomahally *et al*. (2023) que detectaram a abundância das três fitosubstâncias tanto no extrato da casca quando no suco da romã, porém com prevalência dos ácidos elágico e gálico no extrato da casca e dos isômeros de punicalagina no suco. Toledo-Merma *et al*. (2022) também verificaram estas fitosubstâncias em abundânica no extrato aquoso de casca de romã (MAHMOOD *et al*., 2023).

Estudos realizados em nosso laboratório por Freitas *et al*. (2020) demonstraram que o extrato hidroalcóolico de *P. granatum* nas concentrações de 150mg/mL, 75mg/mL, 37,5mg/mL e 18,7mg/mL após 1 hora de tratamento promoveu a redução da atividade das redutases bacterianas, bem como a incorporação de iodeto de propídeo por citometria de fluxo demonstrando alterações de permeabilidade da parede e membrana celulares de *S.aureus*, *E.coli* e *S. agalactiae*. Esses dados nos levaram a avaliar as alterações na integridade das membranas de cepas ATCC de *S. aureus* e *E. coli*, representantes das cepas causadoras de mastite clínica e mastite ambiental, respectivamente por citometria de fluxo e quantificação de DNA nos sobrenadantes das culturas após tratamento com o extrato.

De acordo com os resultados dos nossos experimentos, o extrato etanólico da casca de *P. granatum* mostrou promover alteração na integridadede membrana das cepas de *E. coli* e *S.aureus* que foi avaliada por citometria de fluxo pela incorporação de iodeto de propídeo,um agente intercalante fluorescente capaz de se ligar às moléculas de DNA entre suas bases, não atravessar passivamente as membranas celulares devido ao seu alto peso molecular e por sua relativa lipofobia, que não o permite adentrar em células intactas. O presente trabalho observou 20.000 eventos num intervalo de tempo de 30, 60 e 120 segundos de exposição das suspensões

bacterianas ao extrato nas concentrações 50 mg/mL, 25 mg/mL e 10 mg/mL. Quando foram comparadas as medianas de intensidade de fluorescência do controle não tratado com as suspensões bacterianas tratadas com as diferentes concentrações do extrato, observamos um aumento superior a 100% para as duas cepas testadas em todos os períodos de tempo. Embora as duas espécies testadas possuam diferenças estruturais de membrana visto serem representantes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, se pode observar a eficácia do extrato. As medianas de intensidade em FL3 são maiores no período de 30 segundos e decaem com o tempo. Esse decaimento na intensidade da fluorescência nos levou a especular a lise bacteriana. Portanto, em próxima etapa, foi determinada a concentração de DNA nos sobrenadantes das culturas após tratamento com a menor concentração do extrato (10mg/mL) por 30 segundos. Os dados obtidos corroboraram com os resultados obtidos pela citometria de fluxo, que apresentaram aumento significativo de concentração de DNA no sobrenadante das culturas tratadas com o extrato em torno de 236,5% para *S.aureus* e 573,7% para *E.coli* quando os controles, não tratados, foram tomados como 100%.

Semelhantes resultados foram obtidos por Susilawhati *et al.* (2020) que afirmaram que os componentes fenólicos do extrato de *P. granatum* danificam a membrana plasmática bacteriana levando ao extravasamento de seu conteúdo, inibem o processo da DNA girase e causam disrupção da produção de ATP e do transporte transmembrana, podendo também ser absorvidos pela parede celular bacteriana e romper suas estruturas. Guanghui *et al*. (2020) observaram o aumento do extravasamento do conteúdo celular das cepas analisadas com o aumento da concentração de punicalagina, juntamente com o aumento da liberação de potássio e despolarização da membrana, assim podemos perceber que a lise celular e a liberação do conteúdo citoplasmático (o que inclui material genético bacteriano) é característico da interação do extrato de *P. granatum* ou de seus fitosubstâncias isolados como resultado de sua interação com a membrana celular bacteriana.

As imagens de MEV e MET corroboram os resultados anteriores. Foram observadas alterações celulares de *S. aureus* e *E. coli* como redução no tamanho, alteração do formato das células, extravasamento de conteúdo citoplasmático, fragmentação celular, perda da integridade da parede celular e lise nas cultutas tratadas com o extrato quando foram comparadas com as culturas não tratadas. Foram observados agregados protêicos provavelmente decorrente do

extravasamento do conteúdo intracelular e proteínas presentes no meio de cultura visto que os polifenóis têm a capacidade de interagir com proteínas através de interações hidrofóbicas e ligação de hidrogênio, formando assim uma associação. (ALMAJANO *et al*., 2007).

Resultados similares foram observados por Xu *et al*. (2017) que em seu trabalho avaliaram o efeito de punicalagina sobre amostras de *S. aureus* depois de quatro horas de interação com as células, de modo a também evidenciar seus efeitos na superfície celular e consequentemente a morte celular. Evidências semelhantes foram observadas por Xu *et al*. (2023) considerando *S. aureus* organizadas em biofilmes. Guanghui *et al*. (2020) e Andrade Filho (2024) também evidenciaram por MEV e METos efeitos da ação dos constituintes do extrato de *P.granatum* sobre a membrana celular bacteriana de cepas Gram-negativas.

Esses dados nos levaram a comparar as diferentes concentraçãoes do extrato de *P. granatum* com os desinfetantes mais utilizados nos procedimentos pré-dipping e pós-dipping. Para tal, foram realizados ensaios para determinar a concentração mínima inibitória tanto para o extrato comparando com as concentrações dos desinfetantes comerciais mais utilizados para assepsia de vacas e equipamentos de ordenha, clorexidina e hipoclorito de sódio (SILVA *et al.,* 2024). No presente trabalho, o extrato foi testado para suspensões de *S. aureus* e *E. coli* nas concentrações 10 mg/mL, 25 mg/mL e 50 mg/mL, enquanto a clorexidina foi testada nas concentrações 2,5% e 0,5% e o hipoclorito de sódio a 2% e 0,5%. Os resultados obtidos mostraram o efeito bactericida do extrato nas concentrações 25 mg/mL e 50 mg/mL para ambas as cepas do estudo, no entanto, a concentração 10 mg/ml apresentou caráter bactericida apenas para *S. aureus* ainda que tenha reduzido consideravelmente a população microbiana de *E. coli.* De forma semelhante, as concentrações 2,0% e 0,5% de clorexidina e 2,5% de hipoclorito de sódio apresentaram caráter bactericida para ambas as cepas, enquanto que a concentração 0,5% de hipoclorito de sódio não foi bactericida para *S. aureus* e apenas reduziu a massa celular de *E. coli.*

Ebrahimnjod, Ebadi, Monsouri-Najand (2020) observaram que um melhor efeito antimicrobiano nas concentrações intermediárias e mais alta do extrato aquoso utilizado em seu trabalho (12 mg/poço e 24 mg/poço, respectivamente), tendo esse efeito sido observado tanto em *S. aureus* cepa ATCC, cepa ATCC MRSA e em *S. aureus* isolados de leite bovino, mostrando efeitos até mesmo sobre cepas resistentes a antimicrobianos, apresentando o potencial do extrato de romã para combate a cepas

resistentes a antibióticos. Ainda, se observou que as concentrações intermediárias e mais altas do extrato (1,9 mg/ml e 30 mg/ml) obtiveram melhor efeito antibiofilme sobre as mesmas cepas com destaque para as cepas isoladas de leite bovino em que o efeito antibiofilme foi maior, de modo que se pode investigar o potencial uso do extrato de romã como sanitizante considerando seu efeito antibiofilme e antimicrobiano.

Considerando os resultados obtidos na análise fitoquimica que demonstraram ser a punicalagina a substância majoritária encontrada no extrato utilizado, podemos especular que atividade bactericida pode estar associada a essa fitosubstância visto que estudos realizados por Campus (2021) terem demonstrado que a punicalagina promoveu a inativação de proteínas extracelulares bacterianas, pela interação com o grupo sulfidril e redução do pH, formação de prótons, e precipitação de proteínas do protoplasto e da membrana plasmática que por consequência causa mudanças em sua funcionalidade e perda do conteúdo citoplasmático. Além disso, ácidos elágico e gálico que são isômeros da punicalagina desempenham papel de modulação do potencial de membrana plasmática, e pela acidificação da interface promovendo distúrbios nas bombas e canais protêicos de membrana, que resulta na inibição de proteínas carreadoras de nutrientes e cofatores enzimáticos, e na consequente inibição do crescimento bacteriano, diminuição da resistência a agentes antimicrobianos e morte celular bacteriana (SARAIVA *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos de *P. granatum* tem efeitos de precipitação de proteínas, de membrana, efeitos deletérios de inativação de enzimas e inibição da síntese de enterotoxinas, interferência na adesão a substrato e atividade antiquorum-sensing, sendo esses dois últimos relacionados à formação de biofilmes (EBRANHIMNJOD, EBADI, MONSOURI-NAJAND, 2020). Quando comparado ao extrato de demais plantas, o extrato (aquoso, alcóólico e hidroalcóolico) de *P. granatum* apresentou vantagens por seu efeito significativo em baixas concentrações principalmente quanto a agentes causadores de mastite (tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas), e também contra cepas isoladas do leite e de vacas e também contra cepas resistentes a antibióticos como *S. aureus* ATCC MRSA e *E. coli* ATCC ESBL, por exemplo (MOSTAFA *et al*., 2018; EBRANHIMNJOD, EBADI, MONSOURI-NAJAND, 2020; KONPUTTAR *et al*., 2022; KASEKE *et al*., 2023; ADIL *et al.*, 2024).

Todos esses achados, mas os resultados obtidos com o extrato de *P.granatum* e os desinfetantes testados com apenas 30 segundos de interação, nos leva a sugerir

uma eficiência do extrato de*P. granatum* como desinfetante quando comparamos aos desinfetantes utilizados.

Na pré-ordenha, as tetas e equipamentos precisam de uma limpeza inicial mais abrangente e que elimine o máximo de possíveis patógenos, como no caso das *S. aureus* presentes nas mãos dos ordenhadores ou na pele das próprias vacas, as concentrações dos desinfetantes nessa etapa são mais altas. Na assepsia pós-ordenha, cujo objetivo é manter o efeito antisséptico com o cuidado de preservar o bem estar das vacas recém-ordenhadas, já que o canal das tetas fica um tempo aberto depois da ordenha, a utilização de uma concentração alta de desinfetantes poderia irritar e até mesmo provocar inflamações nos tetos, assim as concentrações dos desinfetantes são mais baixas, por esses motivos, na etapa de assepsia pós-ordenha as concentrações de ambos os desinfetantes costuma ser 0,5% (LOPES *et al*., 2013; CAMPOLI *et al*., 2013, SAAB *et al*., 2014; DA FONSECA *et al*., 2021; GONÇALVES *et al*., 2023).

Cabe ressaltar que se deve considerar que na fase pré-ordenha, ainda que seja eficiente o papel bactericida das concentrações 2,5% de hipoclorito e 2,0% de clorexidina, esses desinfetantes podem ser prejudiciais a pele do animal , portanto a redução para concentração 0,5% assegura a abrangência e eficácia dos desinfetantes reduzindo a toxicidade e efeitos adversos indesejáveis já que o hipoclorito é citotóxico e causador de reações adversas como ulcerações e reações alérgicas e a clorexidina, ainda que de baixa toxicidade, pode induzir resposta inflamatória (LOPES *et al*., 2013; CAMPOLI *et al*., 2013; SAAB *et al.,* 2014; SANTOS *et al*., 2013; DA FONSECA *et al*., 2021; GONÇALVEZ *et al*., 2023).

Em contrapartida os metabólitos bioativos do extrato de *P.granatum* tem propriedades bactericidas, anti-inflamatórias e promovem a regeneração tecidual (BATISTA *et al*., 2020; MOHAMMADI *et al.,* 2024) interessante para o contexto de mastite bovina, além de serem ecologicamente seguros. Além do fato, de até o momento não terem registros de indução a resistência bacteriana ou de citotoxicidade. A natureza polar dos fitoquímicos de *P. granatum* os torna de fácil solubilização/diluição/incorporação, de possível aplicação industrial visto que o chá da casca de romã já é utilizado no consumo humano e animal (BATISTA *et al*., 2020; GOSSET-ERARD *et al*., 2021; SERAFIM *et al*., 2020; VIDAL *et al*, 2023).

CONCLUSÃO

1. O extrato hidroalcoólico decasca de *P. granatum* tem em seu perfil fitoquímico prevalência de punicalagina, ácido gálico e ácido elágico;

2. O extrato de *P. granatum* nas concentrações de 50mg/mL, 25 mg/mL e 10 mg/mL promoveu alteração da integridade das membranas das cepas *S.aureus* e *E.coli* observada pela incorporação do iodeto de propídeo e liberação do material nuclear observada pela quantificação do DNA;

3. O extrato hidroalcoólico de *P. granatum* na concentração de 10mg/mL por 30 segundos promoveu alterações na estrutura da célula bacteriana de *S.aureus* e *E.coli*, tais como alterações da integridade da membrana, extravasamento do conteúdo citoplasmático e lise celular que foram observadas por MEV e MET.

4. A comparação do efeito do extrato com desinfetantes comerciais tradicionalmente usados (hipoclorito e clorexidina) realizadas pela macrodiluição em caldo e a determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro corrobora o caráter promissor do extrato hidroalcoólico de casca de *P. granatum* visto sua eficácia contra as cepas testadas no estudo, representantes de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (*E. coli* e *S. aureus*, respectivamente) associadas a mastite bovina

PERPECTIVAS

1. Avaliar a citoxicidade das fitosubstâncias em células MAC-T pelo ensaio da redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).
2. Avaliar a toxicidade das fitosubstâncias sobre as atividades de enzimas P-450 hepáticas de camundongos.
3. Elaboração de uma formulação com vista ao uso como sanitizante associado aos procedimentos pré e pós dipping.

REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ, E. D et al. Antibiotic Susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates from sausages in Menkes, Morocco.**Veterinary World**, v.11, n.10, p.1459-1465, 2018.

ACOSTA, A.C et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.7, p.565-573, 2016.

ADAME-GÓMEZ, R. et al. Diversidad genética y factores de virulência de cepas *Staphylococcus aureus* aislados de la piel de úbere bovino. **Revista Mexicana de Ciência Pecuaria**, v.12, n.3, p. 665-680, 2021.

ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária.** 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 10, 653p., 2013.

ADIL, M. et al. Nature's Defence: Harnessing Botanicals to Combat Mastitis. 2024

ADDIS, M.F. et al. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omicsstudies. **Molecular Biosystem**., v.12, p.2359–2372, 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Antimicrobianos - Base teórica e uso clínico**. 2007. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acessado em 27/02/23

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Gerenciamento do uso de antimicrobianos em serviços de saúde**. Publicado em 27/06/2022. Disponível em:https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/gerenciamento-do-uso-de-antimicrobianos-em-servicos-de-saude.Acessado em 27/02/23.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Prevenção e Controle de Infecção e Resistência Microbiana**. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana .Acessado em 27/02/23.

ALMEIDA, N.L. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e imunomodulatória de Punica granatum Linné em dois modelos experimentais in vivo de candidose**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, R. S. et al. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil Ocotea odorífera and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 247, 2020.

ALVES, T; MOREIRA, M. A. S. Mastite bovina: Tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas. **UNICIÊNCIAS**, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2021

ANIMELOXAN. Meloxicam 20 mg/mL injetável.[Livisto]. Portugal: Campifarma; 2019.

ANUALPEC. Anuário de Pecuária Brasileira- 29ª edição. 2022

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos –Bases teóricas e uso clínico:** principais grupos disponíveis para uso clínico. Distrito Federal: ANVISA, 2019.

ANDRADE FILHO, S.M. **Efeito do extrato etanólico de Punica granatum L. na integridade das membranas de Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cenocepacia em crescimento planctônico**. Monografia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2024.

ARCANJO, A. H. M. et al. Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology**, v.10, n.1, p.78 – 88, 2017.

ARCURI, E.F. Bacterial biofilms in the food industry.**Revista Leite e Derivados** ,n. 9, p.40-45, 2000.

ARIAS, M. V. B.; DE MAIO CARRILHO, C.M.D.. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?.**Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

ASSIS, L.S. et al. Avaliação dos efeitos do eugenol em *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo QacC. **V Semana Universitária da Urca XXIII Semana de Iniciação Científica.** 2020.

BACH, A. T. et al. Eficácia do uso de desinfetantes no manejo de ordenha de vacas leiteiras no controle da mastite e seus agentes infecciosos–revisão bibliográfica. Bagé-RS. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 1, p. 188-204, 2019.

BAIÃO, M. G. Farmácia da Barranha, Matosinhos.Relatório de Estágio 2023.

BARROS, L. M. S. et al. Espécies nativas do Cerrado com atividade antimicrobiana de uso na Medicina popular. **Cadernos de Agroecologia**, v. 15, n. 2, 2020.

BASKARAN, S.A. et al. Antibacterialeffectofplant-derivedantimicrobialson major bacterial mastitis spathogens in vitro. **Journal of Dairy Science,** v.92, p.1423-1429, 2009.

BATISTA, Sanderson Vieira et al. Atividade in vitro de extrato de casca de romã sozinho e em matriz de poli (álcool vinílico)/alginato de sódio preparada por eletrofiação. **Default journal**, 2020.

BELÉM, G. M. et al. Plantas do cerrado com atividade antimicrobiana: uma revisão sistemática da literatura. **Research, Society and Development,** v. 10, n. 16, 2021.

BELOTI, V. et al. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Editora Planta, Londrina, 2015. 417p.

BERGER-BACHI, B.; McCALLUM, N. State of the knowledge of bacterial resistance. **International Journal of the Careofth Injured**, v.37, p.20-25, 2006.

BETTANIN, J.et al. Frequência de isolamentos dos Agentes etiológicos da Mastite Bovina no Sudoeste Paranaense. 2019.

BHAT, K. S. Action of arecanut (*Areca Catechu* L.) and its chewingformsonlaboratoryanimalsand its implication on human carcinogenesis-An

assessment. **Indian Journal of Arecanutritional Spices of Medical Plants**, v. 18, p. 56-66, 2016.

BHATT, V. D.et al. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis affected cattle analyse by shotgun sequencing. **Journal of Applied Microbiology.** v. 112, p. 639–650, 2012.

BOTARO, B. G. et al. *Staphylococcus aureus* intramammary infection affect smilkyieldand SCC of dairy cows. **Tropical animal health and production**, v. 47, n. 1, p. 61-66, 2015.

BÖTTGER, E.C; CRICH,D.Aminoglycosides: time for resurrection of a neglected class of antibacterials? **ACS infectious diseases**, v.6, n.2,p.168-172, 2019.

BRASILEIRO, B.G, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Braz. J. Pharm. Sci**,v. 42,p.195-202, 2006.

BROTEL, M,A. et al. Distribution and antimicrobial of clinical and subclinical mastites pathogens in dairy cows in Rhonê-Alpes - France.**Foodborne Pathog Dis**, v.7, n.5, p. 479-487, 2010.

BROWN, A. R. et al. Bacterial efflux inhibitors are widely distributed in land plants. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 267, 2021.

BRUNTON, L.L; CHABNER, B.A; KNOLLMAN, B.C. **Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics.**12a edição. Nova Iorque; 2011.

BUSH, K; BRADFORD, P.A. **β**-Lactamsand **β**-lactamase inhibitors: on overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v.6, n.8, 2016.

CALDERARO, A et al. Molecular basis of interactions between the antibiotic nitrofurantoinand human sérum albumin: A mechanism for the rapid drug blood transportation. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n.16, 2021.

CALDERÓN, J.L.M; MÁRQUEZ, F.C.L; FLORES, P.R. Azitromicina como tratamento contra Chlamydiatrachomatis? **Centro de Pesquisa Biomédica – México**, v.154, n.6, p.689-690, 2018.

CALDORIN, M. et al. Ocorrência de Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância na saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.10, n.110, p.4-20, 2013.

CAMPANHOLO, E. M; PEREIRA, M. S; DO CARMO FILHO, J.R. Perfil da prevalência de infecções enterocócicas e de resistência bacteriana aos antimicrobianos em infecções urinárias comunitárias. **O Mundo da Saúde**, v. 47, n. 1, p. 039-048, 2023.

CAMPOLI, C. C. et al. Influência das condições sanitárias dos equipamentos e das mãos dos ordenhadores sobre a qualidade microbiológica do leite. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. 91, 2013.

CAMPOLINA,J.P. et al. Microbiota e saúde da glândula mamária bovina. **Revista V&Z em Minas,** Ano 39, n.143, 2019

CAMPOS, E. Í.A. et al. Atividade antimicrobiana do extrato, frações e punicalagina da casca do fruto de *Punica granatum frente* a isolados clínicos de vacas com mastite. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, 2021.

CARVALHO, A. C. et al. Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, 2019.

CASSOL, D. M. S. **Boletim Técnico n°2 – Mastite bovina.** Ouro Fino Saúde Animal. 15 p, 2010.

CECCARELLI, D et al. DiversityofPlasmidsand Genes EncodingResistancetoExtended Spectrum Cephalosporins in Commensal*Escherichia coli* From Dutch Livestock in 2007–2017. **Frontiers in Microbiology**, v.10, n.76, 2019

CEPA/EPAGRI - Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola/EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2014-2015.** Florianópolis: Epagri/Cepa, 211p, 2015.

CEPA/EPAGRI - Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola/EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2017-2018.** Florianópolis: Epagri/Cepa, 2018.

CHAVEZ-JACOBO, V.M. A batalha contra as superbctérias: sem antimicrobianos, sem ESCAPE. **TIP**, v.23, 2020.

CHEN, S. L. Genomic Insights Into theDistributionand Evolution ofGroup B *Streptococcus*. **FrontiersinMicrobiology** , v. 10, 2019.

CHENG, W. N; HAN, S. G. Bovine Mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. **Asian-Australasian Journal of Animal sciences**, v. 33, n. 11, p. 1699, 2020.

COBRADO,L. et al.Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors?, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67,p.1159-1162, 2012.

COSTA, S.S. et al. Genetic Diversity of norA, Coding for a Main Efflux Pump of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Genetics** v.9. p. 710. 2018

CRAFT, K. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic resistance and the biofilm phenotype. **Medicinal Chemistry Communications,** v. 10, n. 8, p. 1231–1241, 2019.

CROXEN, M. A. et al. Recentadvances in understand in genteric pathogenic *Escherichia coli.***Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

CRUZ, S. O.; RIBEIRO, J. C. R.; BARRETO, L. M. G. Saúde da Glândula Mamária de Vacas em Lactação: revisão de literatura. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 262-269, 2022.

CRUZ, E. A. M. et al. Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de leite de vacas com mastite. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 13, p. 1-6, 2021.

CURCIO, H.F.E. **Plantas e fitosubstâncias de aplicação no tratamento da mastite bovina: revisão integrativa.** Monografia. Universidade Estadual do Rio de Janeiro - Polo Zona Oeste. 2022

CURCIO, H.F.Q. **Plantas e fitosubstâncias de aplicação no tratamento da mastite bovina: revisão integrativa.**Monografia.Universidade do Estado do Rio de Janeiro- Centro Biomédico - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

CUSSOLIM, P. A. et al. Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* à antibióticos. Revista Faculdades do Saber, v. 6, n. 12, p. 831-843, 2021

DA SILVA, J.M.B; HOLLENBACH, C.D. Fluoroquinolonas x Resistência Bacteriana da Medicina Veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico.**, v.77, n.2, 2010.

DA FONSECA, M. E. B. et al. Mastite bovina: revisão. **Pubvet**, v. 15, p. 162, 2020.

DA SILVA MELO, F. J.; DE LA CRUZ LUI, C. Propriedades farmacológicas da droga vegetal *Punica granatum* L. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 6, p. 202-210, 2021.

DA SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico,** v. 77, p. 363- 369, 2020

DA SILVA, R. S **Caracterização da microbiota da glândula mamária bovina saudável e com mastite subclínica e seleção de bactérias potencialmente probióticas isoladas deste ecossistema**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.

DA SILVA, S.G.M. et al. Resistência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* à antibióticos. **Research, Society andDevelopment**, v. 11, n. 2, 2022.

DA SILVA MELO, Fabio Junio; DE LA CRUZ LUI, Camille. Propriedades farmacológicas da droga vegetal Punica granatum L. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 6, p. 202-210, 2021.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytiscinerea*, *Fusarium sp*. and *Clavibactermichiganensis* subsp. *michigagenesis***. Crop Protection.** v.22, p.39–44. 2003

DALE,A.P; WOODFORD, N. Extra-intestina lpathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriageand clones. **Journal of Infection**, v.71, n.6, p.615-626, 2015.

DANTAS, M. D. A. et al. Estudos biofísicos do processo de interação da caseína e lactalbumina, proteínas alergênicas do leite, com antibióticos de uso veterinário. 2019.

DE ANDRADE SOARES, Ricardo et al. Euterpe oleracea Mart.(Açai) seed extract improves physical performance in old rats by restoring vascular function and oxidative status and activating mitochondrial muscle biogenesis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 75, n. 7, p. 969-984, 2023

DE FREITAS GUIMARÃES, F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairyscience**, v. 96, n. 5, p. 2866-2872, 2013.

DE FREITAS SOUZA, J; DIAS, F.R; DE OLIVEIRA ALVIM, H. G. Resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, n. 10, p. 281-293, 2022.

DE MENDONÇA, B. S. et al. Comparativo entre desinfetantes utilizados no pré-dipping de vacas leiteiras. **Ciência Animal**, v. 30, n. 2, p. 23-33, 2020.

DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, C. D. et al. Inhibition of the essential oil from Chenopodium ambrosioides L. and α-terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry,** v. 262, p. 72–77, 2018.

DE QUEIROZ, A.M. et al. Análise da produção de leite de vaca no estado do Acre. **Scientia Naturalis**, v. 3, n. 1, 2021.

DE SOUZA SULTANUN, R.F. et al. Desenvolvimento de bala mastigável anticárie contendo extrato de Punica Granatum Linn (Romã) e Myrciaria Cauliflora (Jabuticabeira). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10972-10988, 2021.

DE SOUZA LEAL, W. et al. Análise da automedicação durante a pandemia do novo coronavírus: um olhar sobre a azitromicina. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 8, p. 580-592, 2021.

DIAZ, M.A.N et al.Screeningof medicinal plants for antibacterial activities Staphylococcus *aureus* strains isolated from bovine mastitis.**Brazilian Jornal of Pharmacognosy**,v.20, p.724-728, 2010.

DOMINGUES, P. F. **Desinfecção e Desinfetantes.** FMVZ-UNESP- BOTUCATU. s/a.p. 1-19, 2010.

DOS SANTOS, E. P. et al. *Punica Granatum* L.(romã) e atividade antimicrobiana contra o biofilme dental: uma Revisão Bibliográfica. **Ensaios em Ciência Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 23, n. 2, p. 88-93, 2019.

DRUSANO, G.L. Pharmacodynamics of ceftaroline fosamil for complicated skin and skin structure infection: rationale for improved anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v.65, p.33–39, 2010.

DUARTE. M.C.T et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcólicos de espécies da coleção de plantas medicinais. **Brazilian. Journal of Pharmacognosy**, v. 14, p. 6-8, 2004.

EBRAHIMNEJAD, H; EBADI, M; MANSOURI-NAJAND, L. The anti-planktonic and anti-biofilm formation activity of Iranian pomegranate peel hydro-extract against Staphylococcus aureus. **Iranian Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2020.

ED-DRA,A. et al. Prevalence, molecular and antimicrobial resistance of *Salmonella spp.* isolated from sausages in Menknes, Morocco.**Microbial Pathogenesis,** v.105, p.340-345, 2017.

EL-HAMAMSY, S.M.A; EL-KHAMISSI, H.A.Z. Phytochemicals, antioxidant activity and identification of phenolic compounds by HPLC of pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel extracts. **Journal of Agricultural chemistry and biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 79-84, 2020.

EMBRAPA. Anuário do Leite. Embrapa Gado de Leite, 2023.

EUMKEB, G.; SIRIWONG, S.; THUMANU, K. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination Against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. **J. Photochem. Photobiol. B.** v.51, n.117, p.53–247, 2012.

FABRES-KLEIN, M. H. et al. An association between milk and slime increase biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC veterinaryresearch**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2015.

FAGUNDES, H., OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública.**Ciências Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FAZEL, F.; JAMSHIDI, A.; KHORAMIAN, B. Phenotypic and genotypic study on antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolates from bovine mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 355-361, 2019.

FERNÁNDEZ, L. et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research. v.** 69, n.1, p. 1-10, 2013

FERNER, R.E; ARONSON, J.K. **Vinhetas de medicamentos: Azitromicina.** Universityof Oxford, BRASIL., 2020.

FERREIRA, M. S. R. **Perfis de resistência a antibióticos em isolados de Escherichia coli de frangos do campo e de avicultura industrial**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Évora. 2022.

FETSCH, A; JOHLER, S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen.**CurrentClinical Microbioogy**, v.5, n.2, p.88-96, 2018

FONSECA, L.F.L; SANTOS, M.V. Situação atual da cadeia produtiva leiteira do Brasil. **4º Encontro Pesq. Mastites,** Botucatu, p.18-29, 2007.

FONSECA, M. E. B et al. Mastite bovina: Revisão. **Pubvet**, v.15, n.2 p.1-18, 2021.

FONTAINE, F.et al. First identification of boronic species as novel potential inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump. **Journal of Medical Chemistry.** v.57, p.2536– 2548, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED STATES - FAO. **FAOSTAT**. Livestock Primary. 2018.

FREIRE, F. et al. In vitro evaluation of antibacterial glycol extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Syzygium cumini* on coagulase-negative and positive staphylococci biofilm. **21º Congresso de Iniciação Científica Unesp**, São José do Rio Preto, SP. 10p, 2009.

FREITAS, T. F. et al. *Punica granatum L.* inhibits the growth of microorganisms associated with bovinemastitis. **The Natural Products Journal**, v. 10, n. 5, p. 611-620, 2020.

FREITAS, T. M. Susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino frente a hipoclorito de sódio. **Anais do XX Congresso de Iniciação Cientifica - III mostra cientifica**. p. 4. 2011.

GAIKWAD, R. P. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of the *Punica granatum* Peel extract against isolated MDR *salmonella typhimurium*. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences,** v. 7, n. 1, 2023.

GALVÃO, I. C. S. **Resistência bacteriana: uma investigação genômica baseada em mecanismos de resistência contra a azitromicina (2019-2021)**.Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2021

GARCÍA, Y., HERRERA, C., ROJAS, J.Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa enel presente. **Revista Mexicana deCienciasFarmaceuticas**, v.38, p.58-69, 2007.

GARDINER, B. et al. Nitrofurantoinandfosfomycin for resistanturinarytractinfections: Olddrugs for emergingproblems. **Australian Prescriber** , v.42, n.1, p.14–19, 2019.

GEORGE, L. et al. Diseases of the teats and udder. In: **Rebhun's diseases of dairy cattle (2nd edition).** ed. Divers TJ &Peek SF, Saunders, Elsevier, 2008

GHAZVINI, H et al. Virulence factors and antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from cystitis and pyelonephritis. **Turkey Journal of Medical Sciences,** v.49, n.1, p. 361–367, 2019.

GIEDRAITIENE, A et al. CTX-M-producing *Escherichia coli* strains: Resistance to temocillin, fosfomycin, nitrofurantoin and biofilm formation. **Future Microbiology,** v.17, n.10, p.789– 802, 2022.

GILCHRIST, M.J. et al. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. **Environmental Health Perspectives,**v.115, p.313-316, 2007.

GOMES, F. et al. Antibiofilm activity of hydromethanolic plant extracts Against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Heliyon**, v. 5, n. 5, 2019.

GOMES, F. et al. Phenolic Plant Extracts Versus Penicillin G: In Vitro Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 128, 2019.

GOMES, M. A. V. **Relação entre as resistências aos antibióticos e o consumo de antibióticos em Portugal: uma abordagem ecológica**. Tese de Doutorado. 2019.

GONÇALVES, M. S. **Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis.** Tese de Doutorado. 2021.

GONÇALVES, F. N.R. et al. COMPARAÇÃO ENTRE HIPOCLORITO DE SÓDIO E CLOREXIDINA COMO IRRIGANTES EM ENDODONTIA: REVISÃO DE

LITERATURA. **Revista CPAQV-Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida**, v. 15, n. 3, p. 6-6, 2023.

GOSSET-ERARD, C.et al. Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) peels. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129396, 2021.

GSK. Superbactérias: Semana Mundial de Conscientização sobre o Uso de Antibióticos alerta para os riscos do uso indiscriminado do medicamento. Rio de Janeiro, 2020.

GUANGHUI et al. Punicalagin damages the membrane of Salmonella typhimurium. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 12, p. 2102-2106, 2020.

GUEDES, M. K. **Brometo de etídio na identificação de bombas de efluxo em bactérias para controle de mastite bovina: revisão integrativa.** Universidade Federal da Paraíba. Monografia.2021.

GUERREIRO, L. F. **Cefalosporinas e Carbapenemos no tratamento de infeções provocadas por bactérias Gram-negativas**. Tese de Doutorado. 2018.

GUERRERO-SOLANO, J. A. et al. *Punica protopunica*Balf., the forgotten sisters of the common pomegranate (*Punica granatum* L.): features and medicinal properties—a review. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1214, 2020.

GUILHEN, C. et al. Transcription and profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. **BMC genomics**, v. 17, p. 1-15, 2016.

GUIMARÃES, D.O et al. Antibiotics: therapeutic importance and prospects for the discovery and development of new agents. **Química Nova.** v. 33, n.3, p.667-679, 2010.

GUTH, B.E.C. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Membro do Instituto Oswaldo Cruz,** v.97. n.8, p.1085-1089, 2002.

HAENNI, M; CHÂTRE, P; MADEC, J.-Y. Emergence of Escherichia *coli* producing extended-spectrum AmpCβ-lactamases (ESAC) in animals. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 53, 2014.

HAO, H. et al. The Risk of Some Veterinary Antimicrobial Agents Public Health Associated with Antimicrobial Resistance and their Molecular Basis. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 20

HILLERTON, J.E. The Five-Point Mastitis ControlPlan - A RevisoryTutorial .NMC **Annual Meeting Proceedings,** p. 50-147, 2018.

HÖFERL, M. et al. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.459-463, 2009.

HOSSEINZADEH, S; SAEI,H.D. Staphylococcal Species associated with bovine mastitis in the North West of Iran:Emerging Of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Veterinary Science and Medicine,** v.2, n.1, p.27-34, 2014

IMPEY,. R. E; HAWKINS, D. A; SUTTON, J. M, SOARES DA COSTA, T. P .Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 9; n.9, p. 623, 2020.

ISRAEL, L. F. S. et al. Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 06, p. 1943-1949, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal– PPM 2020.** Rio de Janeiro: Sidra, 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2020>. Acesso em: 19 abr. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. SIDRA. Pesquisa Pecuária Municipal. 2018.

IRIARTE,D.F.**Resistência bacteriana aos macrolídeos um olhar sobre a azitromicina.** Monografia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

JAMAS,LT. et al. Parâmetros de qualidade do leite bovino em propriedades de agricultura familiar. **Pesquisa Veterinarya Brasileira** , v.38, n.4, p.573-578, 2018

JIANG, X. et al. Disseminationofantibioticresistance genes fromantibioticproducerstopathogens. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 15784, 2017.

KAHNE, D; LEIMKULEHR, ;, LU, W; WALSH, C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. **Chemical Reviews.** v.105, n.2, p.425-48, 2005.

KARAMPELA, I; DELAMAGA,M .Could respiratory fluoroquinolones, levofloxacin and moxifloxacin prove to be beneficial as an adjunct treatment in COVID-19?.**Archivesof medical research,** v.51, n.7, p.741-742, 2020.

KARAUZUM, H; DATTA, S. K. Adaptive immunity against *Staphylococcus aureus.* **Current Topics in Microbiology and Immunology,** v. 409, p. 419–439, 2017.

KASEKE, T. B. et al. Antibacterial activity of medicinal plants on the management of mastitis in dairy cows: A systematic review. **Veterinary medicine and science**, v. 9, n. 6, p. 2800-2819, 2023.

KAYITSING, J. et al.Antimicrobial Treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. **Journalof Dairy Science**, v.100, n.2, p.1388–1407, 2017.

KEEFE, G. Update oncontrolof*Staphylococcus aureus* and Streptococcus agalactiae for management ofmastitis. **VeterinaryClinics: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203-216, 2012

KEMER, A; GLIENKE, C. L.; BOSCO, L. C. Índices de conforto térmico para bovinos de leite em Santa Catarina Sul do Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 29655-29672, 2020.

KETA, O. D. et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract: potential cytotoxic agent against different cancer cell lines. **Records of Natural Products**, v. 14, n. 5, p. 326-339, 2020.

KLEIN, R. C.et al.*Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesion-encoding genes. **VeterinaryMicrobiology,** v. 160, n. 1, p. 183-188, 2012.

KONPUTTAR, A. et al. Antimicrobial activity of polyphenols extracted from Thai medical plants on extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from healthy dairy cows. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 25, n. 4, p. 501-510, 2022.

KOT, B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. **Polish Journal of Microbiology** ,v.43, 2019.

KRAUSE, K.M. et al. Aminoglycosides: on overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine,** v.6, n.6, 2016.

LAILA, H. J. E.A; SANTOS, R. C. V. Aspectos gerais e mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. **DisciplinarumScientia| Saúde**, v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.

LAMBERT, R.J et al. A study in the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.**Journal Of Applied Microbiology.** v.91, n.3, p.453-462, 2001.

LAMPAKIS, D; SKENDERIDIS, P; LEONTOPOULOS, S. Technologies and extraction methods of polyphenolic compounds derived from pomegranate (*Punica granatum*) peels. A mini review. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 236, 2021.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 1059-1065, 2011.

LAUDANO,J.B.Ceftaroline Fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin.**Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v.66, p.1–18,2011.

LAVEN, R.A., ASHMORE, A., STEWART, C.S. *Escherichia coli* in the rumen and colom of slaughte rcattle, with particular reference to *E.coli*O157.**Veterinary Journal,**v.165,p.78-83, 2003.

LERMINIAUX, N.A.; CAMERON, A. D.S. Horizontal transferofantibioticresistance genes in clinicalenvironments. **Canadian Journalofmicrobiology**, v. 65, n. 1, p. 34-44, 2019.

LIMA NETO, G. A. et al. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 1069-1077, 2015.

LIU, Y. Y. et al. Emergenceofplasmid-mediatedcolistinresistancemechanism MCR-1 in animalsandhumanbeings in China: A microbiologicaland molecular biologicalstudy. **The Lancet InfectiousDiseases**, v.16, n.2, p.161-168, 2016.

LOPES, L. O; LACERDA, M. S; RONDA, J. B. Eficiência de Desinfetantes em Manejo de Ordenha em Vacas Leiteiras na Prevenção de Mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária,** Ano XI – v. 21, p. 1-9, 2013.

LOPEZ, D. et al. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,** v.2, n.7, p.298, 2010.

LOUREIRO, R.J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública,** v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016

LUCHEIS, S.B. Vigilância para *Staphylococcus aureus* produtores de toxinas em leite. **Pesquisa e Tecnologia.**, v.9, n.1, 2012.

MACEDO, R.E.F, JUNIOR, S.B.P. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado do tipo C, comercializado na região metropolitana de Curitiba, PR. **Revista Higiene Alimentar,** n.128, p.103-104, 2005.

MACHADO, E.A; JÚNIOR, C.G.S. Antibióticos de ação gênica mais utilizados pelos produtores rurais no município de Senador Rui Palmeira – Alagoas. **Revista Agrária . Acadêmica.**, v.2, n.3,2019.

MACHADO, G. T. B. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sustentáveis com nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*) visando à terapêutica da mastite bovina.**Tese de Doutorado. 2021.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F.G. Antistaphylococcal activity of Zataria multiflora essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine**, v.17, p.548-550, 2010.

MAIA, N. L. et al. Synergism of plant compound with traditional antimicrobials against *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1203, 2018.

MAIOCHI, R. R.; RODRIGUES, R. G. A.; WOSIACKI, S. R. Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.16, n.29, p. 1237-1251, 2019.

MAPA. **RTIQ – Leite e seus derivados**. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-leite-e-seus derivados#:~:text=Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20MAPA%20n%C2%B076%2C%20de%2026%20de%20novembro,o%20leite%20pasteurizado%20tipo%20A.. Acessado em 28/07/24

MAPBIOMAS. **Brasil revelado 1985-2020.** Coleção 6 (1985-2020). Disponível em: <https://mapbiomas.org/>. Acesso em: 19 abr. 2023.

MARINHO, M. L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007

MARQUES, V.F et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus*spp.e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.33, n.2, p.145-147, 2014.

MARQUES, V. F. et al. **Expressão gênica na formação do biofilme e resistência aos beta-lactâmicos em isolados de*Staphylococcus aureus* provenientes de leite mastítico bovino**. Tese de Doutorado. 2016.

MARTINS, F. W.P; CASALI, A. K. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de Romã (Punica granatum, L.) sobre as bactérias *Escherichia coli* e

Staphylococcus aureus. **BrazilianJournalofDevelopment**, v. 5, n. 11, p. 22970-22980, 2019.

MARTINS, M.L. et al. Qualidade do leite cru dos tanques de expansão individuais e coletivos de um laticínio do município de Rio Pomba, MG: um estudo de caso. **Revista dp Instituto de Laticinios Candido Tostes**, v.68, n.392, p.24-32, 2013.

MATTER, J. A.A; JUNG, C.F. Produção leiteira no Brasil e características da bovino cultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Agora**, v.19, n.1, p.34-47, 2017.

MAURICE, N.M; BEDI, B; SADIKOT, R.T. *Pseudomonas aeruginosa biofilms*: host response and clinical implications in lung infections. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.51, p.415-420, 2018.

MCDOUGALL, S.et al. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. **VeterinaryMicrobiology,** v.12, p.177-185, 2009a.

MELCHIOR, M.B. et al. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?,**VeterinaryJournal**, v.171, n.3, p.398-407, 2006.

MELGAREJO-SÁNCHEZ, P. et al. Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: A review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, p. 1-29, 2021.

MENEZES et al. Microbiota e conservação do leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental- REGET**, v.18, p.76-89, 2014.

MESQUITA, A.A. et al.*Staphylococcus aureus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 308-316, 2019.

METZGER, S.A.et al. UnderstandingtheMilk Microbiota. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice** , v.34, p.427–438, 2018.

MIAO, J et al. Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. **Journal of Food Safety,** p.1-11, 2017.

MIDDAH, S. K.; USHA, T.; PANDE, V. HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from Punica granatum fruit peel. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2013, n. 1, p. 296236, 2013.

MILADI, H. et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymeneand γ-terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 156–163, 2017.

MILKPOINT. **Top 100 2024: Os maiores produtores de leite do Brasil em 2024.** Disponível em :https://www.milkpoint.com.br/top100/2024/. Acessado em 28/07/24

MAHMOOD, M. S. et al. Portrayal of *Punica granatum* L. peel extract through High Performance Liquid Chromatography and antimicrobial activity evaluation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e244435, 2021.

MOHAMMADI, M. et al. Pomegranate: A review of the heavenly healer's past, present, and future. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1245, 2023.

MONTEIRO, N. M. B. B..**Acoustic Pulse Therapy: uma abordagem alternativa no tratamento de mastites bovinas**. 2021.

MORADALI, M.F; GHODS, S; REHM, B.H.A. Activation mechanisms of cellular localization of membrane-anchored alginate polymerase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.83, n.9, p.3499-3516, 2017.

MOREIRA, G. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatumL*inn. sobre Staphylococcus spp. isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 626-632, 2014.

MOREIRA, M. A. S. et al. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em Escherichia coli isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.60, n.6, p.1307-1314, 2008.

MOSTAFA, Ashraf A. et al. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 2, p. 361-366, 2018.

MPATSWENUMUGABO, J.P et al. Prevalence of Subclinical Mastits and Distribution of Pathogens in Dairy Farms of Rubavu Nyabihu District, Rwanda. **Journal of Veterinary Medicine,** 2017.

MUBARACK, H.M. et al. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens.**Journal of Animal and Veterinary Advances ,** v.10, p.738-741, 2011.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SANTOS,G.T.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C. Sul-Leite: **Simpósio sobre sustentabilidade de pecuária leiteira na região sul do Brasil,** Anais. Maringá: UEM/CCA/DZO- NUPEL, p. 206– 217, 2002.

MÜLLER, T; REMPEL, C. Qualidade do leite bovino produzido no Brasil–parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 9, n. 3, p. 122-129, 2021.

MUN, S. et al. Punicalagin suppresses methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 137, n. 4, p. 317-323, 2018.

MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

MUNOZ-DAVILA, M.J. Role ofOldAntibiotics in the Era ofAntibioticResistance. HighlightedNitrofurantoin for theTreatmentof Lower UrinaryTractInfections. **Antibiotics (Basel)**, 2014.

MUSHTAQ, S. et al. In vitro activity of ceftaroline (PPI-0903M, T-91825) against bacteria with defined resistance mechanisms and phenotypes. **JournalofAntimicrobialChemotherapy,** v.60, n.2, p.300-311, 2007.

NADER, T.T et al. **Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina**. 2018

NASCIMENTO, F. R. et al. Antibiotic activity of*Plectranthus ornatos* Codd., a Traditional Medicinal Plant. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2461-2469, 2017.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). PubChem Compound Summary for CID 16129869, **Punicalagin**, 2022a.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) . PubChem Compound Summary for CID 370, **Gallic acid**,2022b.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). PubChem Compound Summary for CID 5281855, **Ellagic acid**, 2022c.

NEIVA, R. **Nanotecnologia: trata mastite e muito mais.** Anuário Leite, São Paulo, p.72–73, 2018.

NORHASLINDA, R. et al. Quantitative and optimization of anthocyanin extracted from pomegranate (Punica granatum) extract by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 4, 2018.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymolon *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56,p.519-523, 2007.

NOVITRI, S.i A; KURNIATI, N.F. Combination effect of ethanol extract of pomegranate peel (Punica granatum L.) and lemongrass stalk (Cymbopogon citratus) against Staphylococcus aureus ATCC 6538. In: **2nd Syedza Saintika International Conference on Nursing, Midwifery, Medical Laboratory Technology, Public Health, and Health Information Management (SeSICNiMPH 2021)**. Atlantis Press, 2021. p. 20-25.

NUNES, G. C. B. **ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA ROMÃ (Punica granatum) NA ODONTOLOGIA: Uma revisão integrativa**. 2023.

OCHWANG'I, D. O. et al. Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 215, p. 233-240, 2018.

ÖKMEN, Gülten et al. Investigation of pomegranate (Punica granatum L.) flowers' antioxidant properties and antibacterial activities against different staphylococcus species associated with bovine mastitis. **Veterinary sciences**, v. 10, n. 6, p. 394, 2023.

OLIVEIRA, M.M.M. Essential oils in the control of bacterial biofilms: *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* enteropathogenic.**Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 138p, 2011.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 1-19, 2018.

OLIVEIRA, E. F. et al. Prevalência de patógenos contagiosos em rebanhos de associação dos criadores de gado holandês do Estado de Minas Gerais, 2011-2012. **Veterinária e Zootecnia**, p.265-268, 2013.

OLIVEIRA, L.K.N; FERREIRA, T.J. **Avaliação dos receituários de antimicrobianos dispensados no Brasil: Uma revisão bibliográfica.**Monografia. 2022.

OLIVEIRA, L; RUEGG, P.L.Treatments of clinical mastitis occurring in cowson 51 large Dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.9, p.5426–5436, 2014.

OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M. et al. Inhibition of the essential oil from Chenopodium ambrosioides L. and α-terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus.***Food Chemestry** v.262, p. 72–77, 2018.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 165-185, 2012.

OLSEN, R. H et al.Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. **Avian Pathology**, v.43, n.3, p.199–208, 2014.

O'NEILL, J. **Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste: the review on antimicrobial resistance**. London: Wellcome Trust, HM Government, 2015.

ONICIUC, E.A. et al. Presenceofmethicilli-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain. **Trends in Food Science andTechnology,**v.61,p.49-59, 2017.

OPPERMAN, T.J.; NGUYEN, S.T. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. **Frontiers in Microbiology.** v.6, p.1–16. 2015.

ORDONHO, R. F. **Identificação do perfil de resistência antimicrobiana de cepas do gênero *Staphylococcus* spp. oriundas de casos de mastite em rebanhos leiteiros do agreste paraibano.** Universidade Federal da Paraíba. Monografia, 2021.

OTTO,M .Staphylococcal biofilms. **In:Bacterial Biofilms,** Springer Berlin Heidelberg,p.207-228, 2008.

PANI, A.; LAURIOLA, M.; ROMANDINI, A.; SCAGLIONE, F. Macrolídeos e infecções virais: enfoque na azitromicina na patologia de COVID-19., **Jornal internacional de agentes antimicrobianos.**, v.56, nº2, p.1-18., 2020.

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus.***Future Microbiology.** v.2, n.3, p.323– 334, 2007.

PAPARELLA, A et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*.**Food Control**.v.19, n.12, p.1174-1182, 2008.

PARRON, M. C. et al. Perfil toxicológico e efeito antioxidante e antiglicante in vitro de um extrato glicólico do resíduo do fruto da *Punica granatum:* Toxicological profile and in vitro antioxidant and antiglycolic effect of a glycolic extract of the fruit residue of *Punica granatum*. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 11, p. 73934-73951, 2022.

PASCU C, HERMAN V, IANCU I, COSTINAR L. Etiology of mastitis and antimicrobial resistance in dairy cattle farms in the Western partofRomania. **Antibiotics (Basel)**,v.11, n. 1, p.57, 2022.

PATRICK, G.L. AnIntroductionto Medicinal Chemistry. 5a ed. Oxford: Oxford University Press; 2013.

PEIXOTO, M. M.R et al. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 105-109, 2015.

PEREIRA, R. et al. **Análise quantitativa de flavonoides no extrato da espécie Punica granatum L.(romã)**. 2022.

PEREIRA-MAIA, E.C et al. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química nova,** v.33, n.3, 2010.

PETON, V; LE LOIR, Y.*Staphylococcus aureus* in veterinary medicine.**Infections, Genetics and Evolution**, v.21, p.602-615, 2014.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.319- 402, abr. 2006.

PIETERSE, R. et al.Mode of action and in vitro susceptibility of mastitis pathogens to macedocin ST91KM and preparation of a teat seal containing the bacteriocin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.133-145, 2010.

POIREL, L. et al. AntimicrobialResistance in *Escherichia coli.***Microbiology Spectrum,** v.6, n.4, 2018.

POLLIT, E. J. G. et al.*Staphylococcus aureus* infection dynamics.**PLoSPathogens**, v. 14, n. 6, p. 1-26, 2018.
.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses,** v.53, p.12-15, 2010.

POZZO, M D.A.L et al. Activity o fessential oils from spices mastitis *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. 2011.

QUARESMA, D. M. O. et al. Estudo fitoquímico e farmacológico de *Solanumsubumbellatum*Vell.(Solanaceae). 2023.

QUIGLEY, L. et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiol Rev**. v. 37, n.5, p.664-698, 2013

RAFEY, A. et al. Analysis of plant origin antibiotics against oral bacterial infections using in vitro and in silico techniques and characterization of active constituents. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1504, 2021.

RAINARD, P. et al. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transbound Emergency Diseases**, v. 65, p. 149 -165, 2018.

RAITZ, M. F. et al. **Estudo do fitness de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) isoladas no estado de Santa Catarina.** Monografia. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Florianópolis. 2022.

RAMALHO, A. C. et al. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a S*taphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1285-1288, 2012.

RAPOSO, P. B. F. Perfis de sensibilidade entre amostras de *Escherichia coli* isoladas a partir de uroculturas de mulheres atendidas ambulatorialmente, no Hospital Universitário Antônio Pedro. 2023.

RAY, S; DAS, S; SUAR, M. Molecular Mechanism of Drug Resistance. **Drug Razi Institute**, v. 76, n., p. 1-7. 2021.

REIS, Karla Terezinha M. Gollner et al. Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: revisão. **Journal of Health Sciences**, 2013.

REUK-NGAM, N. et al. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. **BioMedical Research International**, v. 2014, 2014.

RIAZ, L. et al. Fluoroquinolonas (FQs) no meio ambiente: uma revisão sobre sua abundância, sorção e toxicidade no solo. **Chemosphere**, v.191, p.704-720, 2018.

RIBEIRO, A. M. F. et al. **Uso terapêutico de quinolonas e avaliação dos padrões de consumo de antibióticos numa farmácia comunitária**.Dissertação de Mestrado. 2021.

RODRIGUES, F. F M et al. **Análise do potencial antimicrobiano do extrato de Punica granatum L.(Romã) frente aos microrganismos Staphylococcus aureus e Candida albicans.**2023.

RINALDI, M. et al. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. **Functionaland Integrative Genomics,** v.10, 2010.

ROBERTS, M; SCHWARZ, S. Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, andHumans. **JournalofEnvironmentalQuality,** v.45, p. 576-592, 2016.

RODRIGUES, C. et al. Natural sanitizers pre-and post-milking in the prevention of bovine mastitis: Sanitizantes naturais pré e pós-ordenha na prevenção da mastite bovina. **Concilium**, v. 24, 2024.

ROSA, M.S. **Prescrição de antibióticos em odontopediatria: revisão de literatura.** Monografia. 2021.

SÁ, et al. Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental,** Pombal, v. 12, p.01- 13, 2018.

SAAB, Andreia Bittar et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 835-843, 2014.

SAISING,J. et al. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p.1793-1800, 2011.

SANCHES, S. N. et al. Ação Antimicrobiana do Extrato de Punica granatum linn. no Biofilme Dental e sua Aplicabilidade como Antisséptico para Resina Acrílica. **Ensaios em Ciências Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 27, n. 4, p. 390-395, 2023.

SANTIAGO, MCP de A. et al. **Determinação de punicalagina em romã (*Punica granatum* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência.** Comunicado TécnicoEmbrapa**.** 2014.

SANTOS, M. V. **Controle de mastite e qualidade do leite – Desafio e Soluções /** Marcos Veiga dos Santos e Luis Fernando Laranja da Fonseca. Pirassununga-SP: Edição dos Autores, 2019. 301p.

SANTOS, M. V. D. et al. **Controle da mastite e qualidade do leite.** Pirassununga-SP:Edição dos Autores, 2019.

SANTOS, P. J. **Bactérias multirresistentes oriundas de mastite bovina: suscetibilidade a antissépticos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.2013.

SATPATHY, S et al. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and AgriculturalBiotechnology,**v.7,p. 56-66, 2016

SARAIVA, Antonio Marcos et al. Atividade antimicrobiana de polifenóis isolados das folhas de Schinopsis brasiliensis (Engl.) guiado por bioautografia. **Revista Fitos.** 2020.

SAUER, K. et al. Biofilms and biocomplexity, **Microbe**, v. 2, n.7, p.347-353, 2007.

SCHELLES, J. L. et al. Uso de extrato de própolis como agente antisséptico para pré e pós dipping em vacas leiteiras. **Agrarian**, v. 14, n. 51, p. 95-101, 2021.

SCHERER, C.B; BOTONI, S.L; COSTA-VAL, A.P. Mecanismos de ação de antimicrobianos e resistência bacteriana. **Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária.** v.4, n.13, p.12-20, 2016.

SCHERF, J. R. et al. Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacCand β-lactamase gene, and its toxicity in the Drosophila melanogaster model. **Microbial Pathogenesis**, v. 149,p. 104528, 2020.

SHARMA, D.et al. Antibiotics versus biofilm: an emerging battle ground in microbial communities. **AntimicrobialResistance&InfectionControl**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2019.

SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journalof Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309-319, 2016.

SHARMA, V. et al. Coagulase gene polymorphism enterotoxigenecity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in in North West India. **Annls of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.16, n.1, p.65, 2017.

SHARUN, K. et al. Advances in therapeutics and management approaches of bovine mastitis: a comprehensivereview.**VeterinaryQuarterly,** v. 41, n. 1, p. 107-136, 2021.

SHEN, F. et al. Phenotype and expression profile analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms and planktonic cells in response tolicochalcone A. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 359-373, 2015.

SILVA, C.R.A.**Perfil de multirresistência a antibióticos de Staphylococcus spp. e Bastonetes Gram-negativos isolados de leite orgânico e derivados.** Monografia. Instituto Federal de Ensino, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro-Campus Maracanã, 2020.

SILVA, V. O. et al. Interferência do extrato natural de jatobá (Hymenaea martiana Hayne) sobre as características físico-químicas e o rendimento do leite e queijo coalho de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, p. 126-132, 2022.

SILVA, L. A. da. **Incidência de mastite clínica e subclínica em uma propriedade rural: agentes etiológicos e sazonalidade.** Monografia. Universidade Federal de Uberlândia. 2023.

SILVA, L. C.A. et al. Avaliação in vitro da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp.isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-4, 2015.

SILVA, S. M. M.da. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado. 2013.

SILVA, T. G. R. Mastite clínica e subclínica em bovinos leiteiros.**Brazilian Journal of Health Review**. 2022.

SILVA, C. R. E A., VIDAL, C. S., VICTORIO, C. P., DE ASSIS, M. C. Natural sanitizers pre- and post-milking in the prevention of bovine mastites. **Concilium,**v. 24, n.12, p. 526–540, 2024

SIMÕES, A.R. P; OLIVEIRA, M.V. M. de; LIMA-FILHO, Dario de Oliveira. Tecnologias sociais para o desenvolvimento da pecuária leiteira no Assentamento Rural Rio Feio em Guia Lopes da Laguna, MS, Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 16, p. 163-173, 2015.

SOARES, K. D. A. et al. Ação de desinfetantes utilizados na ordenha sobre biofilmes em formação e consolidado de Staphylococcus aureus obtidos do leite de vacas com mastite subclínica. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 22, n. 7, p. e5932-e5932, 2024.

SOARES, I.C; GARCIA, P.C. **Resistência bacteriana: a relação entre o consumo indiscriminado de antibióticos e o surgimento de superbactérias**. Monografia. Faculdade Atenas, Paracatu, 2017.

SOARES, W. N. C. **Extrato pirolenhoso de jurema preta e eucalipto como antissépticos alternativos no pós-dipping de cabras leiteiras**. Dissertação. 2020.

SUN. J; DENG, Z; YAN, A. Bombas de efluxo bacterianas multidrogas: mecanismos, fisiologia e explorações farmacológicas. **Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica**, v.453, n.2, p.254-267, 2014.

SOUSA, C.P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como indicador de qualidade de alimentos. **Revista ASP,** v.9, n.1, p.83-88, 2006.

SOUSA, J.C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos.** 2a edição. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa; 2006

SOUSA, M.M. et al. Caracterização genotípica de *Staphylococcus*spp. isolados de mastite de pequenos ruminantes. 2020.

SOUTO, T. S. **Agroindústria leiteira no município de Ituiutaba - MG: Organização/reorganização socioespacial no período de 1960 a 2013**. Dissertação- Universidade Federal de Santa Maria, 143 f., 2016.

SOUTO, T.S; FOLMER, I. A pecuária de leite bovino numa (re) análise: perspectivas e impasses no Brasil. **Caderno de Geografia, Belo Horizonte, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais**, v. 30, n. 2, p. 271-288, 2020.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n.2, p. 253-267, 2014

SUOJALA, L; KAARTINEN, L; PYÖRÄLÄ,S.Treatment for bovine Escherichia coli mastitis– an evidence-based approach. **Journal of Veterinary Pharmacological Therapy**, v.36, n.6, p.521-531, 2013.

SUSILAWATI, Ni Made et al. The potential of ethanol extract of white pomegranate leaves (Punica granatum L) as anti-bacterial. **Jurnal Teknologi Laboratorium**, v. 9, n. 2, p. 145-150, 2020.

SWARTZ, T.H.et al. Meloxicamadministrationeither prior to or after parturition: Effects on behavior, health, and production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, n. 11, p.1–17, 2018. .

TAGLIALEGNA, A. et al. Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005711, 2016.

TAGLIALEGNA, et al. Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 19, p. 2579-2588, 2016.

TALEBI BEZMIN ABADI, A. et al. World Health Organization Report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, v.9, n.4, p.778-788, 2019.

TAM, K; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 1-34, 2019.

TEBALDI, V.M.R. et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28,n.3,p.753-760,2008.

TEIXEIRA, M.L; JUNIOR, Z. P. D.S; VALADARES, I. Verificação de um método analítico para quantificação de cefoperazona por cromatografia em papel de amostras de leite in natura **Anais da Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI)-e-ISSN 2316-7165**, v. 1, n. 15, 2022.

THI, M.T.T.; WIBOWO, D; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International Journalof Molecular Sciences**, v.21, n.22, p.8671, 2020.

THIELMANN, J. et al. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and*Staphylococcus aureus.* **Heliyon**,v.5,p.1-6, 2019.

TINTINO, S. R. **Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de Staphylococcus aureus por substâncias sintéticas de origem natural.** Universidade Federal de Pernambuco. Tese. 2018.

TOLEDO-MERMA, P. R. et al. Phenolic compounds recovery from pomegranate (Punica granatum L.) by-products of pressurized liquid extraction. **Foods**, v. 11, n. 8, p. 1070, 2022.

TOMAZELI, E. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de plantas presentes no estado de Mato Grosso. 2019.

TOOKE, C.L. et al. **β**-Lactamases and **β**-Lactamases Inhibitors in the 21st Century. **Journalof molecular biology,** v .431, n.18, p.3472-3500, 2019.

TRABELSI, Amine et al. Phytochemical study and antibacterial and antibiotic modulation activity of Punica granatum (pomegranate) leaves. **Scientifica**, v. 2020, n. 1, p. 8271203, 2020.

TREMBLAY, Y. D.N; HATHROUBI, S.; JACQUES, M..Les biofilms bactériens: leur importance ensanté animale et ensanté publique. **Canadian JournalofVeterinaryResearch**, v. 78, n. 2, p. 110-116, 2014.

TRENTIN, D. S; GIORDANI, R.I. B; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

UDDIN, M. S. et al. Nootropic and anti-Alzheimer's actions of medicinal plants: molecular insight into therapeutic potential to alleviate Alzheimer's neuropathology. **Molecular neurobiology**, v. 56, p. 4925-4944, 2019.

VELOSO, W.B. **Determinação de antibióticos macrolídeos sobre eletrodo impresso de carbono modificado com carbon black super p em sistema bia-amp.** Dissertação. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

VENUSOVA, E. et al. Physiological and immune functions of punicalagin. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2150, 2021.

VIDAL, C et al. Medicamentos fitoterápicos e aplicação veterinária em âmbito nacional. **Acta Science et Technicae,** v.11, p.83-101, 2023

VIGUIER, C. et al. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-493, 2009.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina Willd.*, *Fabaceae* (*Leguminosae*). **Brazilian Jouurnal of Pharmacogenesis ,** v.15, p.137-142, 2005.

VLAEMINCK, J. et al. Exploring virulence factors and alternative therapies against Staphylococcus *aureus* pneumonia. **Toxins**, v. 12, n. 11, p.1-31, 2020

VLIEGHER, S. et al.Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Sciences**, v.95 ,n.3,p.1025-1040, 2012.

WANG, D. et al. Vascular Protective Effects Of Pomegranate (*Punica granatum* L.). **Frontiers in pharmacology**, p. 544, 2018.

WATERS, A.E et al. Multidrug-resistant*Staphylococcus aureus* in US meatandpoutry. **Clinical InfectiousDiseases**, v.52, n.10. p.1227-1230, 2011.

WERNECKE, D. et al. Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: abordagem multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , v.68, n.2, p.506-516, 2016.

WHO.**Critically Important Antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non human use.** 5 th rev. Geneva: World Health Organization, 2017.

WIMMERSTEDT, A.; KAHLMETER, G. Associated antimicrobial resistance in *Escherichia coli,Pseudomonas aeruginosa,Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and*Streptococcus pyogenes*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p. 315-321, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research Discovery and Development of New Antibiotics. World Health Organization, Geneva, 2017. .

XU, J et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Leters onApplied Microbiology** v.47, n.8, p.174-179, 2008.

XU, Y. et al. Antimicrobial activity of punicalagin against *Staphylococcus aureus* and its effect on biofilm formation. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 5, p. 282-287, 2017.

XU, Y. et al. Antibiofilm effects of punicalagin against Staphylococcus aureus in vitro. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1175912, 2023.

YATSUYANAGI, J.; SATTO, S.; ITO, I. A case of hemolytic uremic sindrome associated shigatoxin 2- producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. **Japanese Journal Infection Disease**, v.55, p.174-176, 2002.

ZANETTI, E. J. **Avaliação da atividade antimicrobiana do própolis, óleo de geraniol e extrato de casca de abacate no controle de microrganismos causadores de mastite bovina.**Monografia. 2022.

ZAPOTOCZNA, M; O'NEILL, E; O'GARA, J P. Untangling the diverse and redundant mechanisms of f*Staphylococcus aureus* biofilm formation. **PLoS Pathogens,** v. 12, n. 7, p. 1-6, 2016.

ZHAO, Y. et al. A comprehensive review on mechanism of natural products Against *Staphylococcus aureus.* **Journalof Future Foods**, v. 2, n. 1, p. 33-41, 2022.

ZHYLKAIDAR, et al. Prevention of Bovine Mastitis through Vaccination. **Archives of Razi Institute**, v. 76, n. 5, p. 1381, 2021.
ZOUMPOPOULOU, G. et al. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. **International Dairy Journal**, v. 67, p. 46-60, 2017

APÊNDICE - Natural sanitizers pre- and post-milking in the prevention of bovine mastitis

Sanitizantes naturais pré e pós-ordenha na prevenção da mastite bovina

DOI: 10.53660/CLM-3592-24M08

Natural sanitizers pre- and post-milking in the prevention of bovinemastitis

Sanitizantes naturais pré e pós-ordenha na prevenção da mastite bovina

Received: 20-05-2024 | Accepted: 23-06-2024 | Published: 26-06-2024

Carenn Rodrigues e Almeida Silva ORCID: https://orcid.org/0000-0000-0000-0000 Universidade do Estado do Rio de Janeiro, BrasilE-mail: carennrasbiopesq@gmail.com
Camila Silva Vidal
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2842-3059
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, BrasilE-mail: camila.s.vidal2@gmail.com
Cristiane Pimentel Victório ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2815-3725 Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: cristiane.victorio@uerj.br
Maria Cristina de Assis
ORCID: https://orcid.org/ 0000-0002-6548-921X
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, BrasilE-mail: mariacristina@uezo.edu.br

ABSTRACT

Approaches focused on improving animal health are essential strategies to increase the quality and productivity of the livestock sector. Bovine mastitis is a prevalent disease in dairy farming worldwide. There are various ways to prevent infections and mammary inflammation in cows, such as using sanitizersor disinfectants before and after milking to clean the cow's udder surface and reduce contamination. Chlorine-based disinfectants are commonly used, and in some cases, antibiotics are used to prevent mastitis. This review aimed to analyze scientific articles that used plants as a sanitizer for a cow's udder in the last 5 years. There were few records of experiments with plants for disinfecting cows' udders; a total of 10 articlesand 12 plant species were mentioned, including twice *Piper betle* and *Acacia nilotica*. Among the classes of metabolites indicated as active are terpenoids, flavonoids, and tannins. Studies indicate that plant extractsexhibit antimicrobial properties. Plant-based disinfectants promote sustainable and environmentally friendly sanitation in the livestock production sector, as these products are biodegradable and renewable.

Keywords: Bovine mastitis; Udder; Teat asepsis; Disinfectant resistance; Eco-friendly disinfectants

RESUMO

Abordagens que apostam na sanidade animal são estratégias para impulsionar a qualidade e produtividade do setor pecuário. A mastite bovina está entre as doenças de maior prevalência na pecuária leiteira mundial. Entre as estratégias utilizadas na prevenção da infecção e consequente inflamação mamária das vacas podemos citar os sanitizantes aplicados antes e depois da ordenha para higiene da superfície do úbere da vaca e reduzir as contaminações. Existem desinfetantes de uso longevo e comum como os a base de cloro, e até o uso de antibióticos como preventivo da mastite. O objetivo desta revisão foi fazer um levantamento de artigos científicos com plantas como saneante do úbere da vaca nos últimos 5 anos. Foram poucos os registros de experimentos com plantas para desinfecção das tetas das vacas, totalizando 10 artigos e 12 espécies vegetais citadas, e duas vezes *Piper betle* e *Acacia nilotica*. Entre as classes de metabólitos indicados como ativos os terpenoides, flavonoides e taninos. Estudos mostram que extratos vegetais apresentam propriedades antimicrobianas. Os desinfetantes à base de plantas compactuam com uma proposta sustentável e de saneamento ambiental na cadeia produtiva do setor pecuário, uma vez que estes produtos são biodegradáveis e renováveis.

Palavras-chave: Mastite bovina; Úbere; Assepsia da teta; Resistência a desinfetantes; Desinfetantes ecológicos

INTRODUCTION

Sanitizers are disinfecting agents that are used to prevent, reduce, or eliminate the microbiological load on surfaces. The use of disinfectants to clean the teats of dairy cows before and after milking is a sanitary measure. This helps reduce the local microbial load and transmission of mastitis-causing agents in the herd (CHENG; HAN, 2020). This is an important safety measure in dairy management, as it has been proven to effectively eliminate microorganisms, especially bacteria, from the surface of tissues (LOPES et al., 2013; BACH et al., 2019). According to EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation) investing in animal health measures is strategic, especially considering that Brazil is one of the main livestock and milk-producing countries (BRITO et al., 2021).

Various parameters, including concentration or dilution, temperature, exposure duration, organic matter presence, surface type, microorganism susceptibility, and health guidelines for cow handlers, affect disinfection efficacy (MORALES-UBALDO et al., 2023). Multiple chemical disinfectants are used during sanitation procedures before and after milking. Since there is no perfect disinfectant product, several factors are considered before making a choice, such as non-toxicity for animals and humans, effective disinfectant properties, and cost-effectiveness. The most disinfectant used are chlorhexidine, iodine, sulfonic acid, chlorine, sodium hypochlorite, and chlorous acid and to avoid undesirable effects emollients such as glycerin, lanolin, propylene glycol, sorbitol, vegetable oils, minerals, and collagens are added to these substances (DOMINGUES, 2010; BACH et al., 2019). The main target microorganisms associated with bovine mastitis are *Streptococcus dysgalactiae*, *S. uberis*, *Staphylococcus* spp., and fecal coliforms such as *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Some of the environmental bacterial agents are opportunistic, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *S. uberis* (PERES NETO; ZAPPA, 2011; FREITAS et al. 2020).

Studies have compared disinfectants to standardize concentration and exposure time to optimize cow udder hygiene. BACH et al. (2019) reviewed the main disinfectants used in milking management in dairy herds. Other researchers conducted comparative trials applying disinfectants to bacterial cultures of strains related to bovine mastitis (Table 1) (RAMALHO et al. 2012, SILVA et al. 2015, PEIXOTO et al. 2015, and DE MENDONÇA et al. 2020). The authors carried out experimental trials with *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis on dairy farms to different exposure times and

concentrations of disinfectant. RAMALHO et al. (2012) used chlorhexidine, iodine, chlorine, and quaternary ammonium, while SILVA et al. (2015) used the same disinfectants, replacing chlorine with sodium hypochlorite. The first study demonstrated varying susceptibility to each disinfectant at different exposure times, while the second study showed a 100% reduction in microbial load for all disinfectants tested after 30 and 60 minutes of exposure (RAMALHO et al. 2012, SILVA et al. 2015).

Ensuring proper aseptic care of cows' teats is crucial for preventing and managing mastitis among dairy cows. It is important to use disinfectants that meet quality standards and effectively reduce the quantity of microorganisms that cause bovine mastitis.

Table 1 - Sanitizers commonly used in the asepsis of dairy cows' teats and the respective concentrations for *in vitro* tests.

Sanitizers	**References**					
	1	2	3	4	5	6
Hypochlorite /Clorine (NaClO/Cl)	NaClO 2,5 %	NaClO 0,62 - 2,5 %	-	Cl 2,5 %	NaClO 2,5 %	
**** Iodine**	1 a 2 %	0,5; 1 e 2 %	0,7%	0,57 %	-	
Chlorhexidine	0,5 %	0,5; 1 e 2 %	2 %	2 %	2,5 %	
Lactic acid	-	-	-	-	3 %	
Quaternary ammonium	-	0,17; 0,34 e 0,68 %	-	4%		
Chitosan						1%

1. BACH et al. 2019, 2. DA SILVA et al. (2014), 3. PEIXOTO et al. (2015), 4. RAMALHO et al. (2012), 5. MENDONÇA et al. (2020), 6. ZHANG et al. (2021)

Among the natural sanitizers used to treat bovine mastitis are essential oils, plant extracts, bacteriocins, and phyto-derivatives (BASKARAN et al., 2009; HÖFERL et al., 2009; PIETERSE et al., 2010; MUBARACK et al., 2011). DAFERERA et al. (2003) and OLIVEIRA-TINTINO et al. (2018) in their work showed that substances of plant origin and their derivatives are a viable and efficient alternative due to the complexity of the structures of these substances that escape bacterial adaptations (CHENG; HAN, 2020).

Antimicrobial resistance is a major global health concern and poses a significant threat to health, food, and security, according to the World Health Organization (WHO, 2023). The search for plant products as antimicrobial agents has increased due to the emergence of resistance to conventional antibiotics and sanitizers, as well as the high cost of developing new synthetic molecules. Plants with demonstrated antimicrobial properties are being targeted for the development of new drugs that can overcome

microbial resistance and are economically viable, showing promising results (GUIMARÃES, 2010; NADER et al., 2018). Brazil is one of the leading countries in milk producer and exporter. Diseases like bovine mastitis result in significant economic losses and reduced production capacity (MARQUES et al. 2020, VIDAL et al. 2023). However, there are few scientific studies on natural products for veterinary use, especially concerning sanitizers for bovine udders (VIDAL et al. 2023). This review compiles researches on plant-based disinfectants for pre- and/or post-milking use, providing an overview and encouraging further research on natural sanitizers.

MATERIAL AND METHODS

This article presents the findings of research on sanitizers that are used to prevent bovine mastitis. Our research followed a well-defined protocol. Firstly, we selected relevant databases and conducted a thorough search for scientific articles published in the last 5 years (2019-2024). Secondly, we carefully selected articles that met our specific criteria. Finally, we extracted and organized the data from those articles.

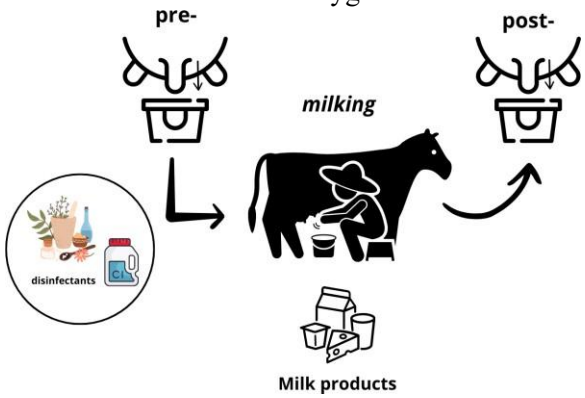
The searches were conducted in the following databases: SciELO (Scientific Electronic Library Online), Lilacs (Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences), PubMed (National Library of Medicine), ScienceDirect and Scopus. Scientific article surveys were performed using a combination of keywords - “teat dipping” AND “plant extract”, “teat dipping” AND “natural product”, teat AND milking AND plant extract, teat AND dipping AND plant, milking AND “plant extract” AND sanitizer, milking AND “plant extract” AND disinfectant. We did not consider review articles. After excluding articles that did not involve cow, teat, plant, bovine mastitis, disinfectants, and/or sanitizers, a data table containing plant species, plant organs, extract types, biological assays, descriptions of tests, and bioactives was done.

RESULTS AND DISCUSSION

Cow teat disinfection was first documented in 1916, when natural mixture such as pineapple (*Ananas comosus* L. Merril) essential oils were used to reduce microbial proliferation (RASOOL et al., 2021). Disinfection has been a routine procedure applied to dairy cow since the 1960s when the National Institute for Research in Dairying (NIRD, England) improved methods in the dairy industry, made the first scientific evaluations showing the efficiency of teat disinfection to minimize bovine mastitis (VALA et al., 2013; RASOOL et al., 2021). The decontamination process involves more than simply

washing with water and drying the teats. It includes immersing the teats in a disinfectant solution for a few seconds pre- and post-milking (Figure 1). This practice reduces the risk of intramammary infections, maintains the health of the teat tissue, and prevents the entry of microorganisms through skin lesions (VALA et al. 2013; SILVA et al. 2015). Asepsis products may include natural disinfectants like extracts or essential oils with antimicrobial properties, peptides, as well as chemical solutions such as potassium permanganate, zinc, copper, iodine, and others (KOVACEVIC et al., 2023).

Figure 1 – Pre- and post-milking stages where the cow's teats are immersed in the sanitizing solution for hygiene.



Source: Own Authorship (2024)

Conventional chemical methods have been effective, but there are some important factors to consider. Chlorine-based detergents are commonly used for daily disinfection of surfaces, from household cleaning to washing fruits and vegetables. However, there have been reports of public health issues linked to chlorine, including a potential association with an increased risk of certain cancers (MEYER, 1994, SHI et al. 2024). Recent studies have shown that microbial communities forming biofilms can develop resistance to chlorine-based substances (MEHDIPOUR et al. 2023, SHAN et al. 2024). The addition of sodium hypochlorite increases the risk of antibiotic resistance genes (ARGs) to human health even after dosing was discontinued, indicating a persistent response (ZHANG et al., 2023). Research indicates that there are issues with iodine-based antiseptics, including poor tolerability, inactivation of organic matter, and the development of cross- and antimicrobial resistance (BARRETO et al., 2020). Chlorhexidine and iodine-based antiseptics are used to clean skin, wounds, and mucous membranes prior to surgery or other medical procedures, according to internationally recognized standards (KOBURGER et al., 2010). In addition to microbial resistance problems, there are cases of adverse effects such as allergies, irritations, and toxicity.

Chitosan is a non-toxic and biodegradable biopolymer alternative to disinfectant teat cows with sustainable characteristics (ZHANG et al., 2021). Biopolymers inhibit biofilm formation in mammary epithelial tissue due to toxicity to the strains or by providing a physical barrier that prevents infection (MORALES-UBALDO et al., 2023).

Various types of disinfectant formulations and non-antibiotic strategies have been employed over the years to prevent bovine mastitis. These include aerosol sprays, ointments, nanocomposites, nutraceuticals, probiotics, bacteriophages, bacteriocins, peptides, and phytochemicals whose aim to reduce infectious processes in the teats of dairy cows (LOPES, 2022; TOUZA-OTERO et al., 2024). In addition to disinfectant products, many antibiotics are used in dry-cow therapy. They are placed in the cow's udder to prevent or treat initial infections, yielding satisfactory results for the animal's health. However, this practice increases the risk of developing microorganism resistance (GARCIA et al., 2019; LOPES, 2022). It is estimated that 700,000 people die annually due to antimicrobial resistance. In 2050, 10 million fatalities are predicted if there are no scientific alternatives (Neculai-Valeanu et al., 2021).

The use of plants and their bioactive compounds in preventing bovine mastitis offers alternative treatments when faced with microbial resistance or other limitations. Additionally, there is a growing interest in developing environmentally friendly disinfectant products. VIDAL et al. (2023) cited a phytomedicine derived from *Phytolacca decandra* (*Phytolaccaceae*) and *Pulsatilla nigricans* (*Ranunculaceae*) for veterinary use against bovine mastitis, particularly after inflammation has occurred. Table 2 lists the natural herbal products used for cleaning cows' teats. Some studies are fundamental and involve plate diffusion tests in the laboratory to assess their effectiveness against the causative agents of bovine mastitis. Researchers from Asian countries and Brazil conducted the most recent studies. The publications covered *ex vivo*, *in vivo* and *in vitro* researches. One of the plants used as a disinfectant is an aquatic macrophyte from the fern group (Pteridophyte) - *Salvinia auriculata* (*Salviniaceae*), with a broad phytoremediation profile for aquatic ecosystems (LUBIS et al., 2022). Another plant, *Acacia nilotica* (*Fabaceae*), mentioned in two articles, has been used for a long time in various medicinal systems, such as Ayurvedic, Unani and Chinese. It has multiple biological effects, including anti-inflammatory and antibacterial. The main secondary metabolites identified in its extracts are tannins (RATHER et al. 2015). Another plant cited in two research studies, *Peper betle*, has monoterpenes among its active ingredients in the leaves that were tested *in vitro* and *in vivo* directly on a cow's teat

(SUNGKATAVAT et al. 2023). Root extracts from *Salvinia auriculata* improved aseptic conditions in *ex vivo* test models of teats excised from killed cows (PURGATO et al. 2023). Some commonly used plants for the sanitation of cow teats include lavender, rosemary, oregano, and cinnamon (Table 2).

The bioactives of plants used to sanitize cows' udders include tannins, terpenoids such as cineole, eugenol, carvacrol, and thymol, as well as flavonoids (Table 2). The main types of plant extracts used as sanitizers are polar or essential oils. Plant extracts are complex mixtures containing different substances related to classes of secondary metabolites such as terpenoids, flavonoids, alkaloids, etc. (KHARE et al., 2020; VICTÓRIO et al., 2022). Variations in metabolites among species were observed in quality and concentration, often depending on the plant organ used. Different organs involved with the extracts obtained for the tests include leaves, flowers, fruits, rhizomes, stems, roots, and bark (Table 2).

The evolutionary origin of plant secondary metabolism pathways involves species' defense responses or the promotion of benefits that culminate in reproductive and population survival processes to deal with the nuances of ecological conditions (KHARE et al., 2020; MAYNARD et al., 2020; VICTÓRIO et al., 2022). The major metabolites in a plant may not always correspond to the bioactive components for a particular usage, especially if the action is linked to the complexity of the extract and the metabolites' synergy or, conversely, to an isolated substance (VICTÓRIO et al., 2022). Nevertheless, studies using medicinal plants are guided by knowledge of secondary metabolites and their biological activity.

CONCLUSION

Some microorganisms pose a threat to the stability of livestock systems. Efforts are needed to control diseases in dairy cows and ensure high-quality production to meet national and international demand. Sanitary measures such as cleaning the cow's teats before and after milking, and guidance to cattle keepers and milkers are critical steps.

Investing in bovine health and environmental research has contributed to increasing productivity and improving the country’s economy. The diverse flora provides a rich source of secondary metabolites with potential eco-friendly antimicrobial properties, and there are no reports of microbial resistance. This article presents an overview of plant-based sanitizers used to prevent cow mastitis and suggests further study in this field.

DOI: 10.53660/CLM-3592-24M08

Table 2 - Studies on the use of natural plant-based disinfectants to control bovine mastitis from 2018 to 2024.

Plant species	Extract	Part	Biological assay	Results	Bioactives	Ref
Salvinia auriculata *(Salviniaceae)*	Hexane (spring)	Root powder	Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to evaluate the effectiveness of the antiseptic formulation using an excised teat model (*ex vivo*) and comparing it with commercial formulations.	The formulation disrupted biofilms of all S. aureus isolates, with reduction ranging from 90 to 100% at the concentrations MIC, 2 × MIC, and 4 × MIC.	Stigmast-22-ene-3,6-dione, β-sitosterol and octadecanoic acid 6	1
Eucalyptus globulus *(Myrtaceae)*	Essential oil	**ND**	An *in vivo* model was used, in which twenty-four dairy cows were found positive for subclinical mastitis, were selected for chemotherapeutical trials after treatment with essential oils of *Eucalyptus* and Lavender at 2 and 4% applied twice a day for 28 days.	Plant essential oils used as teat dips have better results for the reduction in somatic cell count, pH, milk yield, and colony forming units and increased milk yield in Friesian dairy cattle.	**ND**	2
Lavandula hybrida *(Lamiaceae)*		**ND**			**ND**	
Acacia nilotica *(Fabaceae)*	Methanol, chloroform, distill water and petroleum ether extracts	Fruits	The Minimum Inhibitory Concentration was determined using the plate diffusion method. .	The results demonstrated that the aqueous and methanolic extracts inhibited the growth of all microorganisms.	Glycosides, flavonoids and terpenoids. The tannins were present in methanol and aqueous extracts. Saponin petroleum ether and methanol.	3
Acacia nilotica *(Fabaceae)*	Aqueous	**ND**	Minimal inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests were applied to evaluate the sensitivity for each bacterial isolate to tested commercial disinfectants and *A. nilotica* plant extract by using the broth dilution method	The bactericidal activity of *A. nilotica* plant extract was compared with four tested disinfectants (Tek-Trol, TH4+, Virkon S and peracetic acid) against *E. coli*, *S. aureus and S. agalactiae*. The plant extract has good antibacterial activity against isolated pathogens.	Saponins, anthraquinones, tannins, flavonoids, terpenoids, alkaloids and glycosides	4
Curcuma longa *(Zingiberaceae)*	Methanolic	Rhizome	The antibacterial effects of turmeric extract in combination with various antiseptics (5% povidone iodine, 0.5% v/v hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.5% v/v chlorine (Cl_2), and 0.5% v/v chlorhexidine) were determined using the agar well diffusion method	After combination with turmeric extracts with Cl_2 and Chlorhexidine, a significant reduction in antibacterial activity was observed against almost all strains tested. Combination with H_2O_2 did not reduce its antimicrobial effect.	Curcumin	5
Piper betle *(Piperaceae)*	Ethanolic	Mature leaves	The MIC and MBC values of the extract and BSP (bovine teat dipping solution containing *P. betle* extract) against the clinical isolates of staphylococci were investigated using a broth microdilution assay	Bovine teat dipping solution containing *P. betle* extract showed strong anti-staphylococcal activity against *S. aureus*, *S. chromogenes,* and *S. haemolyticus*. The extract's MIC and MBC values ranged from 0.03 to 2 mg/mL	Hydroxychavicol and Eugenol	6

Lippia origanoides (Verbenaceae)	Essential oils	Leaves	*In vivo* test in which the performance of conventional disinfectants (chlorhexidine 1% and Iodine 2500 ppm) compared with the application of essential oil in applications before and after milking, and the milk samples were also subjected to microbiological analysis, as well as the surface of the teats and udder.	The results revealed that the essential oil (120 µl/mL) was efficient against microorganisms compared to disinfection by conventional product demonstrating the effectiveness of the alternative product in preventing new intramammary infections in dairy cows	Carvacrol, Cymene and Methyl thymol ether	7
Piper betle (Piperaceae)	Ethanolic extract and bacteriocins isolated from lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5	Leaves	The study was carried out *in vivo* with 12 cows selected during their normal lactation period, specifically from the 3rd to the 5th month. Teat immersion was performed in a liquid of iodine, betel leaf extract, or bacteriocin for 5 sec per nipple. Teat dip treatment was applied during the milking process over 21 days on a dairy farm in Cijeruk village, BogorWest Java-Indonesia	Treatment improved the microbiological quality of fresh cow's milk and reduced the incidence of subclinical mastitis in cow udders. Betel leaf extract and bacteriocin can replace the chemical iodine.	Phenolic components (chavicol, hydroxyl chavicol), hydroxyl fatty acids (stearate, palmitic, myristic), and fatty acids (stearic and palmitic)	8
Eugenia caryophyllata (Myrtaceae)	Essencial oil purchased from FERQUIMA, Brazil.	**ND**	Xanthan gum nanoemulsion (FSN) with 20% of the essential oils of the tested plants were tested in bacterial suspension of standard strains by diffusion in agar wells and quantitative assays on the agar surface. Three microbial species associated with bovine mastitis were tested using the following standard strains: *S. aureus*, *E. coli* and *Candida albicans*.	The quantitative tests revealed that both FSN and filmogenic suspension, through simple dispersion, were highly effective at inhibiting the growth of all microorganisms at oil concentrations above 1.0 wt%.	Eugenol, Caryophyllene. Humulene, Isocaryophyllene	9
Origanum vulgare (*Lamiaceae*)		**ND**			Caryophyllene, p-cymene, Terpinene, Carvacrol	
Cinamomum cassia (*Lauraceae*)		**ND**			Cinnamaldehyde, Benzaldehyde, Cinnamyl Acetate	
Eucalyptus urograndis (Myrtaceae)	Pyroligneous extract of *Eucalyptus urograndis* clone I144 (EU)	Firewood logs (wood vinegar)	The in vivo assay involved fifteen cows; specifically lactating females aged 3 to 6 years old. Wood vinegar was applied to the cows' teats for 28 days, and cellular debris was collected every 7 days. In vitro assays were conducted to determine the minimum inhibitory concentration using the broth microdilution method. Cytotoxicity was assessed by culturing bovine teat skin fragments and using the MTT reduction assay.	The cells incubated with 1% pyroligneous extract did not show any morphological changes. In vitro data showed that the extract has antimicrobial activity against S. aureus, *S. agalactiae*, *Salmonella, E. coli*, and *P. aeruginosa*. Whenused in vivo for post-dipping of dairy cows, the extract reduced the microbiological load in the mammary glands from 4.74 to 2.54 CFU, indicating its potential use as an antiseptic. Furthermore, the extract did not exhibit toxicity inmammary gland cells derived from lactating cows, as evaluated by MTT colorimetric assay.	Phenolic compounds	10

MIC - *Minimum Inhibitory Concentration* — MBC - *Minimum Bacterial Concentration* — CRD - *Completely Randomized Design.* ND – not detected. References: 1. PURGATO et al. (2023), 2. RASOOL et al. (2021), 3. ABDALLAH et al. (2020), 4. OBID ALLAH et al. (2020), 5. CHAISRI et al. (2019), 6. SUNGKATAVAT et al. (2023), 7. MARCELO et al. (2020), 8. KOMALA et al. (2023), 9. BARREIROS et al. (2022). 10. DA SILVA et al. (2023).

DOI: 10.53660/CLM-3592-24M08

ACKNOWLEDGEMENTS

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro [FAPERJ] in Brazil has provided financial support through processes E-26/010.0018868/2019 and SEI-260003/014209/2021, which has enabled our study of plant extracts for combating bovine mastitis.

REFERENCES

ABDALLA, A. A.; MUSTAFA, M. I.; MAKHAWI, A. M. Phytochemical screening and antimicrobial activities studies of *Acacia nilotica* fruit cover. **bioRxiv**, p. 2020.02. 11.943456, 2020.

BACH, A. T. et al. Eficácia do uso de desinfetantes no manejo de ordenha de vacas leiteiras no controle da mastite e seus agentes infecciosos–revisão bibliográfica. Bagé-RS. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 1, p. 188-204, 2019.

BARREIROS, Y. et al. Xanthan gum-based film-forming suspension containing essential oils: production and *in vitro* antimicrobial activity evaluation against mastitis-causing microorganisms. **LWT**, v. 153, p. 112470, 2022

BASKARAN, S.A. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science,** v.92, p.1423-1429, 2009.

BRITO, M.A. et al. **Mastite**. 2021 Disponível em: https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/mastite Acesso em: 13 maio 2024

CHAISRI, W. et al. Screening antimicrobial properties against mastitis pathogens of turmeric extract after combination with various antiseptics. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n. 3, p. 243-248, 2019.

CHENG, W.N; HAN, S.G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - a review. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 33, n.11, p. 1699-1713, 2020.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection,** v.22, p. 39–44, 2003.

DA SILVA, B.A. et al. Use of a product based on wood vinegar of Eucalyptus clone I144 used in the control of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.279, p.109670, 2023.

DE MENDONÇA, B. S. et al. Comparativo entre desinfetantes utilizados no pré-dipping de vacas leiteiras. **Ciência Animal**, v. 30, n. 2, p. 23-33, 2020.

DOMINGUES, P. F. **Desinfecção e Desinfetantes.** FMVZ-UNESP- BOTUCATU. s/a.p. 1-19, 2010.

FREITAS, T.F. et al. *Punica granatum* L. inhibits the growth of microorganisms associated with bovine mastitis. **Natural Products Journal**, v.10, p.1-10, 2020.

GUIMARÃES, D.O et al. Antibiotics: therapeutic importance and prospects for the discovery and development of new agents. **Química Nova.** v. 33, n.3, p.667-679, 2010.

HÖFERL, M. et al. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.459-463, 2009.

KHARE, S. et al. Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. **Journal of Plant Biology,** v.63, p.203–216, 2020.

KOBURGER, T; HÜBNER, N.O; BRAUN, M; SIEBERT J, KRAMER A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n.8, p.1712- 1719, 2010.

KOMALA, I. et al. The effectiveness of applications of betel (*Piper Betel* Linn.) leaf extract and bacteriocin for teat dipping during milking handling in Indonesian dairy farming. **Malaysian Journal of Science**, p. 7-15, 2023.

KOVAČEVIĆ, Z. et al. Is there a relationship between antimicrobial use and antibiotic resistance of the most common mastitis pathogens in dairy cows? **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2022.

LOPES, L. O; LACERDA, M. S; RONDA, J. B. Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária,** Ano XI – v. 21, p. 1-9, 2013.

LUBIS, I. et al. The evaluation for *Salvinia* sp. adaptation to iron concentration on nutrient solution and tidal swamplands soil growing media. **International Journal of Agronomy**, p. 2450100, 2022.

MARCELO, N. A. et al. Efficacy of novel antiseptic product containing essential oil of *Lippia origanoides* to reduce intramammary infections in cows. **Veterinary World**, v. 13, n. 11, p. 2452, 2020.

MARQUES, P.A. et al. Prescrição farmacêutica de medicamentos fitoterápicos. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2019.

MAYNARD, L.D. Secondary metabolites in a neotropical shrub: spatiotemporal allocation and role in fruit defense and dispersal. **Ecology,** v.101, n.12, p. 3192, 2020.

MEHDIPOUR, M. et al. Incidence of co-resistance to antibiotics and chlorine in the bacterial biofilm of hospital water systems: Insights into the risk of nosocomial infections. **Journal of Infection and Public Health**, 16, 1, 210-216, 2023.

MEYER, ST. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública,** v.10, n.1, p. 99–110, 1994.

MORALES-UBALDO, ANA L. et al. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. **Veterinary and Animal Science**, v. 24, n. 21, p.100306, 2023.

MUBARACK, H.M. et al. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research,** v.10, p.738-741, 2011.

NADER, T.T et al. Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 38, n. 9, p. 1713–1719, 2018

OBID ALLAH, N. et al. Evaluation of antimicrobial effect of *Acacia nilotica* plant extract and selected commercial disinfectants against some pathogens causing mastitis. **Mansoura Veterinary Medical Journal**, v. 21, n. 4, p. 193-200, 2020.

OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M. et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α-terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus.* **Food Chemistry,** v. 262, p. 72–77, 2018.

PEIXOTO, M. M.R et al. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 105-109, 2015.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras-revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1-28, 2011.

PIETERSE, R. et al. Mode of action and in vitro susceptibility of mastitis pathogens to macedocin ST91KM and preparation of a teat seal containing the bacteriocin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.133-145, 2010.

PURGATO, G. A. et al. *Salvinia auriculata*: chemical profile and biological activity against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 2401-2411, 2021.

RATHER, L.J.; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, F. *Acacia nilotica* (L.): a review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 2, p. 12-30, 2015.

RAMALHO, A. C. et al. Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a S*taphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1285-1288, 2012.

RASOOL, S. et al. Effect of essential oils of *Eucalyptus globulu*s and *Lavandula hybrida* as teat dips to control subclinical mastitis in Friesian dairy cattle. **European Journal of Medicine and Veterinary Sciences-Novus**, v.2, n.1, 2021.

RUBEN BARRETO, BRIGITTE BARROIS, JULIEN LAMBERT, SURBHI MALHOTRA-KUMAR, VICTOR SANTOS-FERNANDES, STAN MONSTREY. Addressing the challenges in antisepsis: focus on povidone-iodine. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v.56, n.3, p.106064, 2020.

SHAN, L. et al. Biofilm formation and chlorine resistance of microbial communities in household drinking water system: Preliminary idea of using bacteria to control bacteria. **Process Biochemistry,** 141, 179-189, 2024.

SHI, Y. et al. Trihalomethanes in global drinking water: Distributions, risk assessments, and attributable disease burden of bladder cancer. **Journal of Hazardous Materials**, v. 469, p.133760, 2024.

SILVA, L. C.A. et al. Avaliação *in vitro* da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-4, 2015.

SUNGKATAVAT, P. et al. *Piper betle* extract and its application in bovine teat dipping solution inhibit and eliminate biofilms in bovine mastitis-inducing staphylococci. **Veterinary World**, v. 16, n. 10, p. 2135, 2023.

TOUZA-OTERO, L.; LANDIN, M.; DIAZ-RODRIGUEZ, P. Fighting antibiotic resistance in the local management of bovine mastitis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 170, p. 115967, 2024.

WHO. Fact sheet: Antimicrobial resistance. World Health Organization, Geneva, 15 February, 2018. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance

VALA, K.B. et al. Efficacy evaluation of herbal teat dip "mastidip liquid" in sub-clinical mastitis in crossbred cows. **Theriogenology Insight,** v.3, n. 2, p. 47-51, 2013.

VICTÓRIO, C.P. et al. Plant metabolites may protect human cells against radiation-associated damage: an integrative review. **Frontiers in Natural Product Chemistry**, v. 10, p. 154-188, 2022.

VIDAL, C.S.; ANGELI, R.; VICTÓRIO, C.P. Medicamentos fitoterápicos e aplicação veterinária em âmbito nacional. **Acta Scientiae et Technicae**, v. 11, p.83 - 101, 2023.

ZHANG HUI-MIN, JIANG HONG-RUI, CHEN DAI-JIE, SHEN ZI-LIANG, MAO YONG-JIANG, LIANG YUSHENG, JUAN J. LOOR, YANG ZHANG-PING. Evaluation of a povidone-iodine and chitosan-based barrier teat dip in the prevention of

mastitis in dairy cows. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n.6, p. 1615–1625, 2021.

ZHANG, J. et al. Residual chlorine persistently changes antibiotic resistance genecomposition and increases the risk of antibiotic resistance in sewer systems. **Water Research,** v. 245, p. 120635, 2023.