

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *PUNICA GRANATUM* LINNAEUS CONTRA *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA “*in vivo*”

Lauana Aparecida SANTOS¹

Juliana da Silva MENEZES²

Luciana Rosa Alves RUFINO³

Nelma de Mello Silva OLIVEIRA⁴

João Evangelista FIORINI⁵

¹ Acadêmica do Curso de Biomedicina, Universidade José do Rosário Vellano. email: lauanexsantos@hotmail.com

² Aluna de Mestrado em Ciência Animal, Universidade José do Rosário Vellano.

³ Técnica de Laboratório da Universidade José do Rosário Vellano.

⁴ Médica Veterinária, Professora da Universidade José do Rosário Vellano.

⁵ Farmacêutico, Professor da Universidade José do Rosário Vellano.

Recebido em: 14/04/2014 - Aprovado em: 30/06/2014 - Disponibilizado em: 30/07/2014

RESUMO

O uso de plantas com finalidade terapêutica, tem ampla aceitação popular motivando as investigações científicas. A romã (*Punica granatum* L.) é pertencente à família *Punicaceae*, sendo popularmente utilizada para tratar vários problemas de saúde. O presente estudo avaliou seus possíveis efeitos inibitórios contra *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina e ação anti-inflamatória “*in vivo*”. O extrato foi preparado utilizando a casca do fruto de *Punica granatum*. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em teste de difusão de ágar, com 16 cepas de *S. aureus* isolados. Foi realizado o ensaio de edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*, machos. O extrato da casca do fruto em todas as concentrações testadas inibiu todos os microrganismos isolados e também demonstrou redução do edema de pata nas concentrações testadas de 81,25; 162,50; 325 e 650 mg/mL. Os resultados deste estudo podem explicar em parte a utilização de *P. granatum* para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias podendo contribuir para a alternativa terapêutica em Medicina Veterinária.

Palavras chave: *Punica granatum*. Atividade antimicrobiana. Atividade anti-inflamatória. Fitoterapia. Plantas medicinais.

Evaluation of the activity of *Punica granatum* Linnaeus against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and anti-inflammatory action “*in vivo*”

ABSTRAT

The use of plants for therapeutic purposes, has broad popular acceptance motivating scientific research. The pomegranate (*Punica granatum* L.) pertecent is the *Punicaceae* family, is used popularly for several treat health problems. The present study evaluated their possible inhibitory effects against *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis and anti-inflammatory “*in vivo*” action. The extract was using prepared of the *Punica granatum* fresh fruit. The antibiotic activity was evaluated by the agar diffusion method on 16 isolates *S. aureus* strains. Testing of paw edema induced by carrageenan in rats was performed, males. The extract fresh fruit pericarp in the all inhibition concentration tests all isolated microorganisms and too reduction demonstrated of paw edema in the tested concentrations of 81,25; 162,50; 325 and 650 mg/mL. The results of the study may partly explain the use *P. granatum* for the treatment of inflammatory and infectious diseases may contribute to alternative therapy in veterinary medicine.

Keywords: *Punica granatum*. Antimicrobial activity. Anti-inflammatory activity. Herbal Medicine. Medicinal plants.

1. Introdução

A planta *Punica granatum* L. é pertencente à família *Punicaceae* e na

medicina popular é conhecida como romã, romeira, romãzeira, romeira da granada entre outros, sendo esta muito utilizada como planta frutífera, ornamental de parques e jardins. A

romã é uma planta originária da região do Oriente Médio; a árvore cresce em regiões áridas e a produção de seu fruto se dá no período de fevereiro a setembro. A composição química do suco da fruta é constituída de compostos fenólicos como antocianinas, delphinidina, cianidina, pelogodina, quercetina e ácidos fenólico, cafeíco, catequínico, clorogênico, *orto* e *para* cumárico, elágico, gálico e taninos (punicalagina) (MARTINS, 1995; JARDINI e FILHO, 2007).

A romãzeira é popularmente utilizada para tratar vários problemas de saúde, predominando as doenças gastrointestinais. O suco é utilizado contra úlceras na boca e gengivas, dores de ouvido, tratamento de dispesia e disenteria. Suas flores são usadas para o tratamento de gengivas, prevenindo a perda dentária (WERKMAN et al., 2008).

A mastite é a enfermidade de maior frequência no gado leiteiro, tendo como agentes etiológicos principalmente *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*. Características como a virulência de *S. aureus* contribuem para a resistência deste microrganismo no tecido mamário. Vale ressaltar também que o uso inadequado de antibióticos no tratamento pode gerar o surgimento de cepas microbianas resistentes (MEDEIROS et al., 2009). Os medicamentos fitoterápicos começam a ganhar cada vez mais espaço no tratamento veterinário, tanto de

parasitoses como bacterioses (ZAFALON; FILHO; OLIVEIRA e RESENDE, 2007).

A introdução de novos medicamentos no mercado requer inúmeros estudos. Dentre os ensaios laboratoriais destacam-se os testes para avaliação da atividade anti-inflamatória, utilizando o teste de edema de pata para avaliar estas reações, pois o edema justifica-se ser um dos sinais cardeais da inflamação. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina e ação anti-inflamatória “*in vivo*” da planta *P. granatum*.

2. Materiais e métodos

2.1 Coleta das espécimes

Os frutos de *Punica granatum* foram coletados no município de Alfenas, estado de Minas Gerais, Brasil, à beira da Rodovia MG – 179, Km 0, no mês de agosto de 2012 e identificados. A exsicata do vegetal está armazenada no Herbário da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, sob o n° 352.

2.2 Obtenção do extrato

O extrato da casca do fruto de *Punica granatum* foi obtido utilizando-se como agente extrator álcool etílico a 70%, conforme a técnica descrita por Caceres et al., (1995) e Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). As romãs foram abertas e seu conteúdo interno foi retirado. Foram pesados 400 g da casca do

fruto e colocados em 1600 mL de álcool a 70%. Essa mistura foi macerada em balão volumétrico (2000 mL) e armazenada à temperatura ambiente por 15 dias, ao abrigo da luz. Após, o mesmo foi filtrado e mantido sob refrigeração a 4°C em frasco âmbar estéril. Posteriormente, foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado. Na hora do uso, o mesmo foi ressuspenso em água destilada estéril e passado em filtro Millipore® (0,22 µm).

2.3 Aquisição de amostras de animais infectados

Os animais portadores de mastite foram identificados utilizando-se testes como o da caneca de fundo preto e o CMT (California Mastit Test), para clínica e subclínica respectivamente. Antes da coleta, efetuou-se a higienização das mãos do ordenhador e dos tetos das vacas, com solução de água e sabão; em seguida, os tetos foram secos com papel toalha descartáveis. Coletou-se 32 amostras de 25 mL de leite em frascos estéreis identificados, realizadas imediatamente antes da ordenha e foram examinadas vacas em diferentes estágios de lactação. As 32 amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, transportadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, UNIFENAS, Alfenas, MG.

2.4 Exames microbiológicos

As amostras foram semeadas em Ágar Baird Parker, enriquecido com gema de ovo + telurito de potássio, e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, observou-se o crescimento e a morfologia das colônias. Estas foram caracterizadas como *Staphylococcus* spp por análise morfológica e bacterioscopia, empregando-se o método de coloração de Gram.

Após análise morfológica, as amostras foram submetidas a testes bioquímicos para a identificação da espécie *Staphylococcus aureus* (provas de catalase, manitol, coagulase e DNase) conforme Machado (2006).

2.5 Estudo da atividade antimicrobiana da casca da romã

As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI- Brain Heart Infusion - DIFCO); incubadas a 37 °C por 24 h. Foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *P. granatum* realizando-se o teste de difusão em ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), de acordo com os padrões do *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). Foram utilizadas as concentrações de 10,15; 20,31; 40,62; 81,25; 162,50; 325; 650 e 1300 mg/mL. As determinações do perfil de sensibilidade foram realizadas de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo

Mueller Hinton para bactérias, conforme protocolo M7A6 (CLSI, 2003). Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Foram utilizados ratos *Wistar* (170-50 g) machos provenientes do Biotério central da UNIFENAS. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente. Oito horas antes da realização dos experimentos os animais foram privados de ração. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta Instituição (processo nº. 08A/2012).

2.7 Teste do edema de pata induzido por carragenina em ratos

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (1% p/v) administrada na região subplantar da pata direita de ratos *Wistar* machos (n = 6/ 6 grupos); na pata esquerda administraram-se 0,1 mL de solução salina. Uma hora antes da injeção de carragenina, o extrato hidroalcoólico de *P. granatum*, solubilizado em salina estéril, foi administrado, por via oral, nas doses de 650, 325, 162,5 e 81,25 mg/kg (WINTER et al., 1962). O grupo controle negativo recebeu 0,5 mL/kg de indometacina por via oral. Após, as patas

foram aferidas pelo equipamento pletismômetro (Ugo Basile modelo FF34) antes da aplicação da substância pró-inflamatória, e de hora em hora, durante 5 h. Após a aplicação do estímulo, a medida do edema foi feita pela diferença entre o volume deslocado da pata direita e o volume deslocado da pata esquerda. A indometacina 10 mg.kg⁻¹ foi usada como fármaco de referência.

3. Resultado

Dentre as 32 amostras analisadas, provenientes de animais portadores de mastite identificados com casos clínicos e subclínicos da região agropecuária de Alfenas, MG, 16 amostras apresentavam *S. aureus*. Após a realização do teste de atividade antimicrobiana, foi observado sensibilidade a todas as concentrações testadas 10,15; 20,31; 40,62; 81,25; 162,50; 325; 650 e 1300 mg/mL.

Na verificação da atividade antimicrobiana, observou-se a formação de halos de inibição entre 21 a 30,5 mm em todas as cepas isoladas de *S. aureus* (Tabela 1). Os resultados obtidos, na Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), foram positivos para todas as cepas microbianas em concentrações variadas de *P. granatum* (Tabela 1).

Tabela 1 – Halos de Inibição, Concentração Inibitória Mínima e Concentração Microbicida Mínima do extrato hidroalcoólico da casca de *P. granatum*

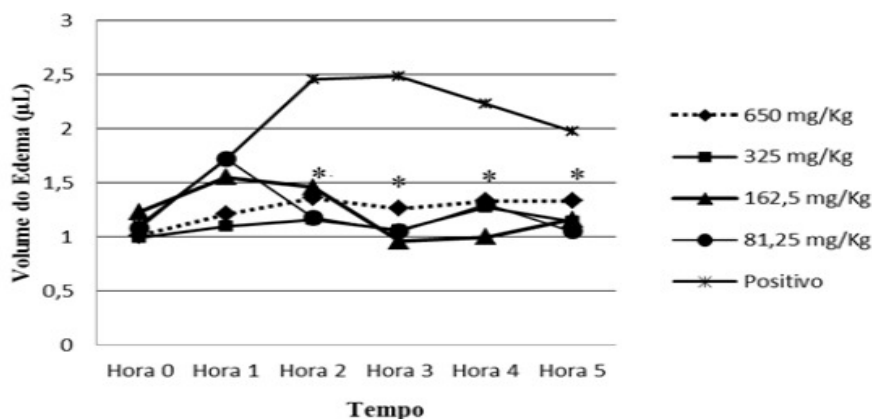
Microrganismo	Halos de Inibição (mm ³)	CIM* (mg/mL do extrato)	CMM** (mg/mL do extrato)
Amostra 1	30,5	325	650
Amostra 2	24	40,62	325
Amostra 3	26	40,62	325
Amostra 4	26	20,31	162,5
Amostra 5	25,5	10,15	325
Amostra 6	26,5	40,62	325
Amostra 7	25,5	10,15	325
Amostra 8	21	10,15	325
Amostra 9	24	650	650
Amostra 10	24,5	20,31	162,5
Amostra 11	29,5	325	325
Amostra 12	27	20,31	162,5
Amostra 13	23	81,25	162,5
Amostra 14	25	20,31	162,5
Amostra 15	24,5	20,31	162,5
Amostra 16	26,5	40,62	162,5

Fonte: O autor

O tratamento com diferentes concentrações (650, 322, 162,5 e 81,25 mg/Kg) do extrato de *P. granatum* inibiu a inflamação induzida por carregenina no pico máximo da 3ª hora como mostra a Figura 1. As concentrações de 162,5 e 81,25 mg/Kg do extrato de *P. grantaum*, estatisticamente se

comportaram de forma semelhante a partir da 2ª hora de experimento. A redução do processo edematogênico nos grupos de animais tratados com as diferentes concentrações do extrato foi observada em todos.

Figura 1 - Efeito da administração v.o do extrato de *Punica granatum* (650, 325, 162, 5 e 81,25 mg.Kg⁻¹) e induzido por carragenina (10 mg.Kg⁻¹) sobre o edema de pata. * Significativo após a análise da variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (p<0,05).



Fonte: O autor

4. Discussão

Nas últimas décadas, os fitofármacos têm assumido um papel importante como meio terapêutico alternativo devido ao aumento significativo da ocorrência de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (WERKMAN et al., 2008). A atividade inibitória e anti-inflatória pode ser atribuída a combinação de princípios ativos presentes na planta.

Silva et al., (2008) realizaram a atividade antimicrobiana do extrato da casca do fruto de *Punica granatum* sobre 38 linhagens de *S. aureus* de origem bovina para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os microrganismos testados com este extrato apresentaram sensibilidade formando halos de inibição variando de 10 a 36 mm de diâmetro, apresentando resultados semelhantes a este estudo podendo-se confirmar a eficiência do extrato de *P.*

granatum como alternativa terapêutica na Medicina Veterinária.

Recentemente observou-se que a punicalagina, um tanino elágico derivado do fruto da romanzeira, é provavelmente um dos principais constituintes antimicrobianos desta fruta (MACHADO et al., 2003). Os taninos têm efeito inibitório sobre bactérias e fungos. Existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana. A primeira pressupõe a inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a complexação dos substratos as enzimas; a segunda seria a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo (MELLO e SANTOS, 2002). Por ultimo, a terceira menciona a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo, a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos.

Machado et al., (2003) realizou estudos avaliando o potencial antimicrobiano de 14 extratos de plantas tradicionais brasileiras no tratamento de doenças infecciosas frente a microorganismos de importância médica e multi-resistentes. Extratos de *P. granatum* foram eficazes contra cepas de *S. aureus*. Braga et al. (2005) verificaram in vitro que o extrato da romã também inibiu o crescimento de *S. aureus*, dependente da concentração dos extratos.

Os extratos de plantas são geralmente uma mistura de compostos ativos e inativos e suas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes devem ser interpretados com critérios. Vale ressaltar que o local, período e tipos de solventes utilizados na extração dos princípios ativos podem interferir na atividade biológica do extrato (MELO et al., 2012).

A atividade antimicrobiana dos extratos de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lippia graveolens*, *Zingiber officinale*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* e *Ocimum basilicum* foi avaliada, utilizando 32 isolados de *Staphylococcus* spp, oriundos de rebanhos leiteiros bovinos, onde observaram a CIM para todos os extratos testados em diferentes concentrações (POZZO et al., 2011).

Bezerra et al., (2009) realizaram ensaios de ação antimicrobiana sobre 25 isolados de casos de mastite bovina, observando que o extrato de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) demonstrou potencial antimicrobiano em diferentes concentrações testadas. Nader et

al., (2010) também avaliaram o potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de algumas plantas endêmicas do Cerrado, dentre elas *Baccharis dracunculifolia*, *Cochlospermum regium*, *Croton antisiphiliticus*, *Eugenia dysenterica* e *Lippia sidoides*, contra *S. aureus* isolados de leite mastítico. Os resultados demonstraram que os extratos de *Baccharis dracunculifolia*, *Croton antisiphiliticus*, seguido do extrato de *Lippia sidoides*, apresentaram, respectivamente, melhor atividade inibitória sobre *Staphylococcus aureus* ressaltando a importância de plantas medicinais como recurso terapêutico.

A carragenina promove um processo inflamatório provavelmente mediado por prostaglandinas, apresentando um pico máximo entre 2 e 3 horas após a sua aplicação (ARA et al., 2010). Este dado confirma os resultados observados na Figura 1 comparativamente ao controle positivo. Dessa maneira observa-se que houve a redução de efeito dose-resposta nos edemas por carragenina tratados com o extrato de *P. granatum*.

A redução do edema de pata está relacionada com a interrupção do mecanismo de síntese de prostaglandina (SILVÉRIO et al., 2008). Anteriormente demonstrou-se que o extrato de *P. granatum* é rico em taninos e outros compostos fenólicos. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou

polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, o processo curativo ocorrer naturalmente (MONTEIRO; ALBUQUERQUE e ARAÚJO, 2005). Sendo assim é possível que a presença destes possa ter influenciado na redução do edema assim como o fármaco de referência Indometacina (anti-inflamatório não esteroide).

Dentre os mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório da romã, estudos realizados demonstraram que a mesma é capaz de inibir a ativação de vias inflamatórias incluindo o NF- κ B³. Vale ressaltar que as proantocianidinas e as antocianidinas, princípios ativos isolados da planta, podem inibir a atividade da ciclooxigenase e a produção de óxido nítrico (HOU et al., 2003). As elangitaninas podem reduzir a sinalização celular inflamatória em modelos laboratoriais de células de câncer de cólon. O ácido punico e os polifenóis podem inibir a biosíntese de prostaglandinas (LANSKY et al., 2007). Estima-se que os componentes do suco de romã podem agir de forma sinérgica na supressão da expressão das citocinas inflamatórias (LANSKY et al., 2007).

Em um estudo realizados por Ara et al., (2010) foi verificado que a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico (400 mg/kg) da planta *Adenantha pavonina* L,

apresentou 37,10% de inibição da inflamação na primeira hora do experimento e, o extrato extraído com diclorometano (400 mg/kg) apresentou 33,11% na inibição da inflamação na terceira hora do experimento, sendo que foi comparável ao resultado da substância de referência diclofenaco sódico.

Silvério et al., (2008) avaliaram a atividade anti-inflamatória da planta *Eremanthus erythropappus*. O edema de pata foi induzido por carragenina sendo verificado que o mesmo foi reduzido em 23,81% (100 mg/kg) e 47,62% (200 mg/kg). Os resultados apresentados indicam que o extrato etanólico de *E. erythropappus* pode constituir alvo potencial para uso em terapias da dor, inflamação e úlcera.

5. Conclusão

A partir destes resultados pode-se sugerir que o extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* possui atividade antimicrobiana em diferentes concentrações sobre *S.aureus* isolados de casos de mastite bovina e atividade anti-inflamatória, a qual foi dose depende sobre o edema induzido por carragenina.

6. Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

7. Referências

ARA, A. et al. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., Fabaceae, in experimental animals. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2010; 20(6):929-932.

BRAGA, L.C. et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005. v.96, n.1-2, p.335-9.

BEZERRA, D.A.C. et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastites bovina *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009;19(4):814-817.

CARCERES, A.; MENÉNDEZA, H.; MÉDEZ, E. et al. Antigonorrhoel activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J Ethnopharmacol.* 1995;48(2):85-8.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5th ed. São Paulo: Atheneu; 2010. v. 1-2.

JARDINI, F.A.; FILHO, J.M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos

da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;43(1).

LANSKY, L.P.; NEWMAN, R.A. *Punica granatum* (pomenagrate) and its potential for prevention and treatment of inflamtion and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007. 109(2):177-206.

HOU, D.X.; OSET, T.; LIN, S. et al. Anthacyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: Struture – activity relations and mechanisms involved. *Int J Oncol.* 2003. 23:705-712.

MACHADO, T.B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphilococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2003. v.21, n.3, p.279-84.

MACHADO, T.R.O. Susceptibilidade a antimicrobianos por cepas de *Staphylococcus coagulase-negativa* isoladas de leite mastítico bovino proveniente de propriedades leiteiras de 9 estados brasileiros.[Tese]. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal; 2006.

MARTINS, E. *Plantas medicinais.* Viçosa: UFV. 1995;162-163.

- MEDEIROS, E.S. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.* 2009;29(7):569-574.
- MELO, M.S.F; ROCHA, C.Q; SANTOS, M.H. et al. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* mart. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações.* 2012. v. 10, n. 2, p. 43-51.
- MELLO, CP; SANTOS, SC. Taninos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Organizadopor Cláudia Maria Oliveira Simões et al. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS /Ed. da UFSC. 2002. pp. 950.
- MONTEIRO JM, Albuquerque UP e Araújo EL. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova.* 2005;28(5):892-896.
- NADER TT, et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. *Arq. Inst. Biol.* 2010;77(3):429-433.
- (NCCLS) National Comitte for Clinical Laboratory Standart. Padrões de desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana: padrão M2-A6 aprovado, 6ª ed. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
- POZZO MD, et al. Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2011;63(5):1229-1232.
- SILVA MAR, et al. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008;18(2):209-212
- SILVÉRIO MS, et al. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch (Asteraceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008;18(3):430-435.
- ZAFALON LF, FILHO NA, OLIVEIRA JV, REZENDE FD. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*2007;59(3):577-585.
- WERKMAN C, et al. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). *Rev. Bras. Pl. Med.*2008;10(3):104-111.