

TEOR DE TANINOS CONDENSADOS EM EXTRATOS NATURAIS DE SHINOPSIS BRASILIENSIS COM EFICÁCIA IN VITRO FRENTE PATÓGENOS CONTAMINANTES DO LEITE BOVINO.

Autores: EMANUELLY GOMES ALVES MARIANO, ADRIANA GONÇALVES FREITAS, MATHEUS FERREIRA INÁCIO, JOÃO CARLOS FIGUEIREDO, FRANCIELLEN MORAIS-COSTA, ANA CLAUDIA MAIA SOARES, EDUARDO ROBSON DUARTE

Introdução

A disponibilidade nutricional do leite, o torna vulnerável ao crescimento de microrganismos patogênicos. As contaminações ocorridas nesse produto podem ser provenientes do úbere e tetos da vaca, dos equipamentos e utensílios de ordenha, dos ordenhadores e dos tanques de expansão (NERO et al., 2009). Isso pode interferir diretamente no padrão microbiológico do leite, reduzir a qualidade e a vida útil do produto ou até mesmo torná-lo impróprio para consumo (MARQUES et al., 2012). Além dos grandes prejuízos de ordem produtiva da vaca ocasionados pela infecção da glândula mamária, denominada como mastite.

As bactérias psicrotólicas possuem a capacidade de se multiplicar a baixas temperaturas, embora de forma mais lenta. A contaminação do leite com essas bactérias se dá, geralmente, devido a falhas nos processos de higienização das tetas antes da ordenha e a falhas nos sistemas de limpeza e sanitização dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração ou utensílios que entram em contato com o leite e entre o principal gênero tem-se a *Pseudomonas* (BRITO et al, 1998).

A mastite é uma doença que prejudica tanto o produtor quanto a indústria, promovendo gastos com tratamento, alterações na qualidade do leite, redução no processamento de derivados, entre outros. Dentre os principais patógenos relacionados a esta doença, destaca-se o *Staphylococcus*. Neste contexto, o uso de extratos vegetais torna-se opção como sanitizantes para equipamentos da indústria de alimentos visto que muitas plantas possuem substâncias antimicrobianas muito potentes. Além disso, podem exercer atividade semelhante ou até mesmo superior a dos tradicionalmente utilizados, porém com menor impacto ambiental (BONA, 2014).

A espécie *Schinopsis brasiliensis* é uma planta com grande potencial para ser utilizada como antimicrobiano. É encontrada principalmente na caatinga e pantanal Mato-grossense, popularmente conhecida por braúna, baraúna ou pau-preto (CARVALHO, 2009). A literatura respalda que na composição fitoquímica dessa planta tem-se taninos, flavonóides, antocianinas, saponinas, alcalóides, flavonóis e flavonas que são potentes agentes bactericidas (BONA, 2014)

Material e métodos

A. Preparo dos Extratos vegetais

As folhas das espécies vegetais foram coletadas no período seco no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG em Montes Claros. Estas foram desidratadas em estufa com circulação forçada de ar a 38°C por aproximadamente 72 horas e moídas em liquidificador industrial. Os extratos aquosos foram produzidos, adicionando-se 1000 mL de água destilada a 100 g de cada espécie vegetal e aquecidos em banho-maria a 40°C durante 60 minutos. Os extratos etanólicos foram obtidos submergindo 100 g do material vegetal em 1000 mL de etanol PA. Em recipientes de vidro âmbar, conservados em local escuro em temperatura ambiente durante dez dias. Foi realizada a filtração em funil com gaze e algodão e incubado em estufa com ventilação forçada a 40 °C por dois dias (NERY et al., 2010)

Após a secagem, 0,35 g do pó obtido foi diluído em água destilada estéril e o volume completado para 75 mL. Essa solução foi filtrada em membrana milipore de 0,22 µm com o auxílio de um kitazato e uma bomba a vácuo para garantir que a ausência de microrganismos na solução.

B. Cepas Bacterianas;

Foram utilizadas como microrganismos testes cepas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

C. Atividade antibacteriana dos extratos

A concentração dos extratos sobre os microrganismos patogênicos foi determinada por meio de testes preliminares de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Os inóculos utilizados para determinação da CIM foram preparados separadamente por meio da suspensão direta, em solução salina esterilizada, de colônias previamente isoladas. A turbidez da suspensão foi ajustada com a solução padrão de McFarland 0,5. A CIM foi determinada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo (NCCLS, 2005). As concentrações obtidas para o extrato aquoso foram 270; 135; 67,5; 33,75 e 16,87 mg·mL⁻¹. O extrato etanólico apresentou concentrações de 185; 92,5; 46,25; 23,12; 11,56 mg·mL⁻¹. A CBM foi determinada a partir do plaqueamento dos tubos que não apresentaram crescimento nas CIM (NCCLS, 2005).

D. Determinação do teor de proantocianidina (tanino condensado)

O teor total de proantocianidinas foi quantificado nos extratos aquoso e etanólico do eixo da inflorescência de *Schinopsis brasiliensis* e nas frações das mesmas, após solvólise catalisada por ácido com n-BuOH/HCl 37% (95:5). Após a reação com n-BuOH/HCl 37% (95:5), procedeu-se leitura da absorbância em espectrofotômetro da solução a 540nm, sendo os valores expressos como cloreto de cianidina (HIERMANN et al., 1986). Os resultados corresponderam a média de três determinações.



Resultados e discussão

O extrato aquoso avaliado sob as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentou CIM 135 mg.mL⁻¹ respectivamente. A concentração bactericida mínima deste extrato foi 135 mg. mL⁻¹ para a estirpe de *S. aureus*, em contrapartida não foi encontrado valor de CBM para *P. aeruginosa*, o que indica que o presente estudo não encontrou a concentração do extrato aquoso que causa a morte deste microrganismo. O extrato etanólico de braúna apresentou CIM de 92,5 mg.mL⁻¹ e 46,25 mg.mL⁻¹ para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 respectivamente. A CBM deste extrato foi verificada apenas para o *S. aureus* (Tabela 1).

Pinto et al. (2014) encontrou valores de CIM entre 12,5 e 50 mg.mL⁻¹, para *S. aureus* utilizando extratos (aquoso e etanólico) de folhas *Myciaria cauliflora*, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini*. Para *Pseudomonas aeruginosa*, a CIM e CBM foi 0,39 e 6,25 mg.mL⁻¹.

Foi determinado o teor de taninos condensados de 0,083% ± 0,2 para o extrato aquoso e 0,35% ± 0,3 para o extrato etanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis*. Monteiro et al. 2005, verificou os teores com quantidades relevantes de taninos condensados em folhas de *Anadenanthera colubrine* e *Myracrodruon. urundeuva* de 8,29% e 9,56% respectivamente, plantas também cracterísticas da caatinga.

Segundo Cushnie e Lamb (2005) os taninos estão inseridos no grupo dos flavonoides, podendo interagir com a membrana citoplasmática, inibindo a função e comprometendo a integridade celular e podem também inibir a síntese de ácidos nucléicos e interromper o metabolismo bacteriano.

Conclusão

Os extratos de *Shinopsis brasiliensis* apresentam taninos condensados. A composição química destes extratos naturais apresenta atividade bacteriostática frente às estirpes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aureuginosa* ATCC 27853.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Desenvolvimento (CNPq). Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG).

Referências bibliográficas

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J.C. Qualidade do leite. Juiz de Fora, Embrapa/Tortuga, p. 98,1998

CARVALHO, P. E. R. Braúna-do-sertão (*Schinopsis brasiliensis*), 2009. **Embrapa**. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/5941/Comunicado_Tecnico_222.pdf?sequence=1>. Acesso em: 07 abr. 2017.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **26**, 343-356, 2005.

HIERMANN, A., KARTNIG, T.H., AZZAM, S., 1986. Einbeitragzurquantitativenbestimmung der procyanidine in crataegus. *Sci. Pharm.* **54**, 331-337.

MARQUES, S. C.; EVANGELISTA, S. R.; PICCOLI, R. H. Diversidade e resistência a antibióticos de bactérias psicrotóricas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 670-676, 2012.

MONTEIRO, J.M.; NETO, E. M. F. L.; AMORIM, E. L. C.; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, E. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v.29, n.6, p.999-1005, 2005

NCCLS (2005) **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. [Online]. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf>. Acesso em 18 maio 2016.

MORAIS-COSTA, F.; BASTOS, G.A.; SOARES, A.C.M.; COSTA, E.G.L.; VASCONCELOS, V. O.; OLIVEIRA, N.J.F.; BRAGA, F.C.; DUARTE, E.R.; LIMA, W.S. *In vitro* and *in vivo* action of *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary parasitology* **223**, 43-49, 2016.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, V.29, n.2, p. 386-390, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n2/24.pdf>>. Acesso em 10 maio 2017.

NERY, P. S.; NOGUEIRA, F. A.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Effect of *Anacardium humile* on the larval development of gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology* v. 171, n. 1, p. 361-364, 2010.

PINTO, F. G. S.; BONA, E. A.M.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M. MOURA, A. C. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquoso e etanólicos de *S. brasiliensis* para estirpes padrão de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactérias	Extrato Etanólico (mg.mL ⁻¹)		Extrato aquoso (mg.mL ⁻¹)	
	CIM	CBM	CIM	CBM

Realização:



SECRETARIA DE
DESENVOLVIMENTO
CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO
E INOVAÇÃO SUPERIOR



Apoio:



<i>S. aureus</i> ATCC 25923	46,25	46,25	135	135
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	92,5	> 185	135	> 135