

## **Análise da atividade antimicrobiana de taninos totais de plantas aromáticas do Nordeste brasileiro**

**Andréia Vieira Pereira<sup>1</sup>, Tatiane Kelly Barbosa de Azevêdo<sup>2</sup>, Gregório Mateus Santana<sup>3</sup>, Luiz Fernando Annunziata Trevisan<sup>4</sup>, Severino Silvano dos Santos Higino<sup>4</sup>, Maria Regina Macêdo-Costa<sup>5</sup>, Maria do Socorro Vieira Pereira<sup>5</sup>, Sérgio Santos Azevedo<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Aluno (a) do Programa de Pós-graduação em Patologia experimental, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia 445, Km 380, CEP 86057-970, Londrina, PR. E-mail: andreiavet@hotmail.com

<sup>2</sup>Aluno (a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos- CEP: 52171-900, Recife, PE. E-mail: tatiunekellyengenheira@hotmail.com

<sup>3</sup>Aluno (a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais UFRRJ, Rodovia BR 465, CEP: 23897-000, Seropédica, RJ. E-mail: gregorioengflorestal@gmail.com

<sup>4</sup>Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG/CSTR. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110. Patos – PB. E-mail: higinosss@hotmail.com; luztre@msn.com

<sup>5</sup>Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFPB. Av. Cidade Universitária - João Pessoa, PB, CEP - 58059-900. E-mail: mariareginamacedo@yahoo.com.br; vieirapereira@uol.com.br

<sup>6</sup>Prof. (a) Dr. (a), Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB, Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110, Patos-PB. E-mail: sergio@vps.fmvz.usp.br  
Bolsista do CNPq

### **Resumo**

O objetivo do estudo foi determinar *in vitro* a atividade antibacteriana de substâncias tanantes isoladas de *Mimosa tenuiflora*, *M. arenosa* e *Piptadenia stipulacea* sobre amostras de *Staphylococcus* multirresistentes de origem bovina. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos 4 linhagens bacterianas de origem animal pelo método de difusão em meio sólido, os taninos foram dissolvidos de forma seriada em água destilada em concentrações inicial de 500 µg/mL. Os taninos de *Mimosa tenuiflora* (CIM=31,25 µg/mL) e *Piptadenia stipulacea* (CIM = 62,5 µg/mL) e *M. arenosa* (CIM=15,6 µg/mL) inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* formando halos que variaram de 10 a 17 mm sendo a respectivamente. Os resultados demonstram que todas as amostras de *S. aureus* são sensíveis as diluições das soluções tânicas das três espécies estudadas, sendo menos sensível aos taninos da *P. stipulacea*, com halos que variaram de 10 a 17mm, nas diluições 1:1 a 1:8. Os resultados deste estudo são promissores e mostram a importância de se avaliar meios alternativos no combate a infecções e ao desenvolvimento de resistência a drogas em *S. aureus*.

**Palavras-chave:** Taninos, Bactérias, Espécies da caatinga.

### **Abstract**

**Analysis of antimicrobial activity of total tannin aromatic plants in Northeast Brazil.** The objective of this study was to determine *in vitro* antibacterial activity of tannin substances isolated from *Mimosa tenuiflora*, *M. arenosa* and *Piptadenia stipulacea* on multidrug-resistant strains of *Staphylococcus* bovine. Minimum inhibitory concentration (MIC) of 4 extracts bacterial strains of animal origin by the diffusion method on solid medium, tannin was serially dissolved in distilled water at concentrations initial from 500 µg/mL. Tannin *Mimosa tenuiflora* (CIM=31.2 µg/mL) e *Piptadenia stipulacea* (CIM = 62.5) e *M. arenosa* (CIM=15.6 mg/mL) inhibit *Staphylococcus aureus* growth forming halos ranging from 10 to 17 mm. The results show that all samples of *S. aureus* are sensitive to dilution of the tannin solutions of the three species studied, being less sensitive to tannins of *P. stipulacea*, with halos that varied from 10 to 17mm, the dilutions 1:1 to 1:8. The results of this study are promising and show the importance of evaluating alternative ways to fight infections and the development of drug resistance in *S. aureus*.

**Keywords:** Tannins, Bacteria, Caatinga species.

## Introdução

Os *Staphylococcus aureus* ocupa lugar de destaque na etiologia das infecções (Botaro et al, 2015; Elhaig & Selim 2015; Burns et al, 2014) e sua versatilidade em adquirir resistência aos antibióticos tornou-se uma preocupação universal. Com o surgimento e a disseminação de cepas cada vez mais virulentas e multirresistentes, há uma necessidade de rever o panorama dos fatores de contribuem à patogênese da resistência desta bactéria (Snel et al. 2014; Velázquez-Meza 2005), despertando nos últimos anos o interesse em plantas com atividade antimicrobiana.

A atividade antibacteriana de compostos fenólicos foi estudada *in vitro* por Rhodes et al. (2006). Além disso, esses compostos se constituem em fontes naturais antioxidantes em comparação aos sintéticos, largamente utilizados, e sem efeitos indesejáveis em processos enzimáticos ou orgânicos (Arvanitoyannis et al. 2006). O objetivo neste trabalho foi determinar *in vitro* a atividade antibacteriana de substâncias tanantes isoladas de *Mimosa tenuiflora*, *Mimosa arenosa* e *Piptadenia stipulacea* sobre amostras de *Staphylococcus aureus* multirresistentes de origem bovina.

## Material e Métodos

### *Espécies estudadas e coleta do material*

Nesta pesquisa, foi avaliado o potencial tânico e sua atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* de três espécies florestais que ocorrem no Semi-Árido brasileiro, sendo elas, jurema preta, jurema vermelha e jurema branca. As cascas de jurema-preta foram coletadas no Núcleo de Pesquisas do Semiárido (NUPEÁRIDO), município de Patos, PB, propriedade da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e as cascas de jurema-vermelha foram obtidas na Fazenda Lameirão (propriedade da UFCG), localizada no município de Santa Terezinha, PB. E as cascas de jurema-branca foram obtidas próximo a BR-230. Com o intuito de representar a variabilidade genética existente entre e dentre as plantas, de cada espécie amostrada, foram selecionados cinco exemplares, sendo retiradas amostras de cascas em três posições, no tronco (base, meio

e topo), nos galhos e nos ramos (diâmetro de até 5,0 cm). Desse modo, a árvore foi integralmente representada. O preparo das cascas para extração e quantificação das substâncias tânicas foi de acordo com a metodologia de Paes et al. (2006), para avaliação da atividade antimicrobiana.

### *Aquisição das amostras de Staphylococcus aureus de origem bovina*

Os isolados clínicos foram coletados de acordo com a metodologia descrita por Bouchot et al. (1985). Estas amostras foram armazenadas em tubos rosqueados estéreis, identificados e enviados sob refrigeração em caixas de material isotérmico, para a realização do exame microbiológico, e identificação do *Staphylococcus aureus*, além das amostras clínicas, foi também utilizado amostra padrão de ATCC 29213, no Laboratório de Genética e Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba- CCEN, onde foram processadas.

### *Ensaio Comparativos*

Os testes de comparativo com os antibióticos para avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em ágar Mueller Hinton segundo Bauer et al. (1996). Utilizou-se os seguintes discos impregnados de antibióticos: gentamicina (10 mcg), amoxicilina (10 mcg), ciprofloxacina (5mcg), penicilina + novobiocina (10 mcg), cefquinome (30 mcg), florfenicol (30mcg), azitromicina (15 mcg), eritromicina (15 mcg), tetraciclina (30 mcg) + neomicina (30 mcg) + bacitracina (10 mcg), enrofloxacina (5 mcg). Para o teste utilizando os extratos etanólicos sobre as linhagens bacterianas, foram feitas cavidades de aproximadamente 6 mm de diâmetro no ágar-base, as quais receberam 50µL da solução do extrato diluído em água destilada para as concentrações 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, de acordo com as diluições pré-estabelecidas e para o controle negativo utilizou-se água destilada. A concentração inicial de tanino para diluição seriada foi de 500 µg/mL. Estas placas foram mantidas na estufa a 37° C por 24 horas, em que foi considerada como CIM a menor concentração da droga que inibiu completamente o crescimento bacteriano (CLSI, 2010). Para a

comparação da atividade antimicrobiana entre as diferentes concentrações da substância tânica, foi utilizado o teste de Friedman (ZAR, 1999), com nível de significância de 5%, utilizando o programa SPSS for Windows versão 13.0.

### Resultados e Discussão

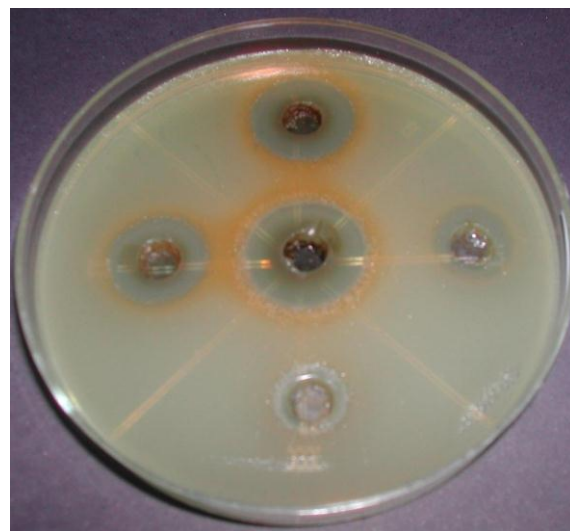
A atividade antimicrobiana das soluções tânicas de jurema vermelha, preta e branca apresentou, respectivamente, um percentual tânico de 17,74%, 18,11% e 12,5% sobre as amostras de *S. aureus* estudadas. Foi conduzida avaliando-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), apontada com base nos diâmetros dos halos de inibição. Foi observada sensibilidade das amostras ensaiadas em baixas concentrações das soluções tânicas com halos de inibição que variaram de 10 a 22 mm para *Mimosa tenuiflora* (Figura 1), de 10 a 20 mm para *Mimosa arenosa* (Figura 2) e de 10 a 17 mm para *Piptadenia stipulacea* (Figura 3) com uma proporcionalidade entre diminuição do diâmetro dos halos e a diminuição da concentração.



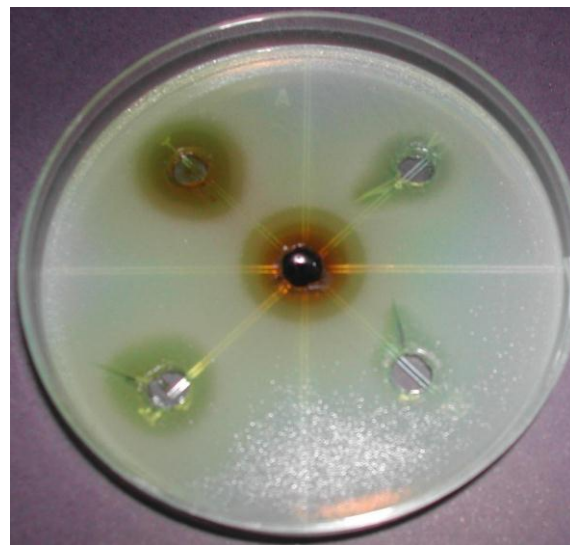
**Figura 1.** Atividade antimicrobiana de taninos isolados da *M. tenuiflora*.

Quanto aos antibióticos foi possível observar que ocorreu diferença significativa para a solução tânica da *M. tenuiflora*, que não foi observada para a *M. arenosa* e observou-se também diferença significativa para as diluições 1:2 em relação a GEN, AMO, CFQ, FLF, ERI, e ENO, e a *P. stipulacea* quando comparado a estes

antibióticos sintéticos nas diluições 1:1 e 1:2, com diferença significativa entre as médias das diferentes concentrações ( $p < 0,001$ ). Com diferença significativa entre a jurema branca e jurema vermelha na diluição 1:8, com médias de halos 11,5 e 13,5 mm respectivamente. Sendo também observado diferença significativa entre a *P. stipulacea* e *M. tenuiflora* nas diluições 1:8 e 1:32, sendo considerado a CIM = 62,5 e 31,25  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. A *P. stipulacea* e *M. tenuiflora* apresentaram médias de halos 11,5 e 14 mm respectivamente na diluição 1:8 e de 7,5 e 11,5 mm respectivamente para a diluição 1:32.



**Figura 2.** Atividade antimicrobiana de taninos isolados da *M. arenosa*.



**Figura 3.** Atividade antimicrobiana de taninos isolados da *P. stipulacea*.



De acordo com Simões (2003), a atividade antimicrobiana apresentada por algumas plantas está diretamente relacionada à presença de taninos nas mesmas, possuindo também caráter bactericida. Segundo o Websters-Online-Dictionary (2014), os taninos são substâncias fenólicas complexas de origem vegetal, que apresentam excelente atividade antimicrobiana e é muito utilizado no curtimento de peles e em medicamentos.

Gonçalves et al. (2005) em estudos sobre a atividade antimicrobiana de algumas árvores nativas do Brasil, observaram uma excepcional atividade antimicrobiana do extrato hidro-alcoólico de jurema preta sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase apresentando halos variando entre 12 e 33 mm. Com o mesmo objetivo, Cordeiro (2014), avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos de (Caroá) *Neoglaziovia variegata*; (Amburana) *Amburana cearenses*; (Jatobá) *Hymenaea martiana*; (Jurema-preta) *Mimosa tenuiflora*; (Angico-de-bezerro) *Pityrocarpa moniliformis* e (Pereiro-de-tinta) *Simira gardneriana* sobre *Salmonella* spp., obtidos de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco. Este observou que o extrato de *M. tenuiflora* apresentou ação antimicrobiana em todos os 60 isolados de *Salmonella* com valor de CIM= 781,3 µg/mL, destacando-se das demais.

Em estudos realizados por Bezerra (2011), que avaliou a atividade da *P. stipulacea* sobre cepas de *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Aeromonas caviae*, este observou que o extrato da casca do caule de jurema branca apresentou uma fraca atividade antimicrobiana, enquanto que os extratos do cerne e folha não apresentaram atividade. Plantas ricas em taninos nativas da Caatinga apresentam uma notável atividade antimicrobiana, atuando estes sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Aziz Abd et al. 2011; Silva et al. 2012). Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias por apresentar um amplo espectro de ação, o que foi observado nos extratos destas plantas por Oliveira-Júnior et al. (2012) os quais testaram extrato etanólico de *N. variegata* e por Figueiredo et al. (2013) verificando-se a ação

do extrato etanólico *Amburana cearensis* e *Anadenanthera macrocarpa* sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de referência e multirresistentes.

O mecanismo de ação dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando uma capa protetora, inibindo enzimas, causando uma ruptura da membrana plasmática e privação do substrato microbiano por formar um complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo, impedindo assim, o desenvolvimento de microrganismos (Haslam 1996; Rodrigues et al. 2014).

Diante do exposto, podemos afirmar que os produtos naturais constituem uma alternativa terapêutica mais econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento. Os resultados obtidos nesta pesquisa são promissores, e de grande significância para o controle de infecções particularmente originadas por amostras de *S.aureus* de origem bovina.

## Conclusão

As soluções tânicas isoladas de *Mimosa tenuiflora*, *Mimosa arenosa* e *Piptadenia stipulacea* apresentam potencial atividade antibacteriana *in vitro* sobre as linhagens de *S. aureus* ensaiadas merecendo um estudo mais aprofundado e possível sugestão para usos terapêuticos.

## Referências

- ARVANITTOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.475-487, 2006.
- AZIZ ABD, S.M.; LOW, C.N.; CHAI, L.C.; ABD RAZAK, S.S.N.; SELAMAT, J.; SON, R.; SARKER, M.Z.I.; KHATIB, A. Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria. **International Food Research Journal**, v.18, p.1195-1201, 2011.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1996.
- BEZERRA D.A.C., RODRIGUES F. F. G; COSTA J.G.M.; PEREIRA A.V.; SOUSA

- E.O.; RODRIGUES O.G. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, p. 99-106, 2011.
- BOTARO, B.G.; CORTINHAS, C.S.; DIBBERN, A.G.; PRADA, L.F.; BENITES, N.R.; SANTOS, M.V. Staphylococcus aureus intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. **Trop Anim Health Prod**, v.47, p.61–66, 2015.
- BOUCHOT, M.C.; CATEL, J.; CHIROL, C.; GANIERE, J.P.; MENEZES, L. E.M. (1985). Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. **Recueil de Medicina Veterinaire**, p. 567-577.
- BURNS, A.; SHORE, A.C.; BRENNAN, G.I.; COLEMAN, D.C.; EGAN, J.; FANNING, S.; GALLIGAN, M.C.; GIBBONS, J.F.; GUTIERREZ, M.; MALHOTRA-KUMAR, S.; SABIROVA, J.S.; WANG, J.; LEONARD, F.C. A longitudinal study of Staphylococcus aureus colonization in pigs in Ireland. **Veterinary Microbiology**, v.174, p. 504–513, 2014.
- CATÃO, R.M.R.; ANTUNES, R.M.P; ARRUDA, T.A.; PEREIRA, M.S.V; HIGINO, J.S.; ALVES, J.A.; PASSOS, M.G.V.M.; SANTOS, V.L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum linn.* (Romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 111-114, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2010. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twentieth information supplement, document M100S20**. Wayne, PA, USA: CLS
- CORDEIRO, J.C.P. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e formação de biofilme pelos isolados de Salmonella spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco**. 2014, 70f. Dissertação (Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco UNIVASF, Petrolina - PE.
- ELHAIG, M.M.; SELIM, A. Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae in domestic bovinds from Ismailia, Egypt. **Trop Anim Health Prod**, v.47, p.271–276, 2015.
- FIGUEREDO, F.G.; FERREIRA, E.O.; LUCENA, B.F; TORRES, C.M.; LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.; SILVA J.M.; SANTOS, F.A.; MEDEIROS, C.R.; OLIVEIRA, G.M.; COLARES, A.V., COSTA, J.G.; COUTINHO, H.D.; MENEZES, I.R.; SILVA, J.C.; KERNTOPF, M.R.; FIGUEIREDO, P.R.; MATIAS, E.F. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Bio Med Research International**, v. 2013, p. 1-5, 2013.
- GONÇALVES, A.L; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.3, p.353-358, 2005.
- GUANGCHENG, Z.; YUNLU, L.; YAZAKI, Y. Extractive yields, Stiasny values and polyflavonoid content in barks from six acacia species In: Australia. Australian Forestry, v.54, p.154-156, 1991.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205–215, 1996.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 3.ed. 1997. v.24, p.114-121.
- OLIVEIRA JÚNIOR, R.G.; ARAÚJO, C. S.; SANTANA C.R.R.; SOUZA, G.R., LIMA-SARAIVA, S.R.G.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; FILHO, J. A. S. ALESSANDRA GOMES MARQUES PACHECO, JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Chemical And Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 4489-4494, 2012.
- PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne**. v. 12, p. 232-238, 2006.
- RHODES, P.L.; MITCHELL, J.W.; WILSON, M.W.; MELTON, L.D. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from

- Vitis vinifera* variety Ribier. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.281-286, 2006.
- RODRIGUES, C.G.; FERREIRA P.R.B.; OLIVEIRA C.S.M.; JÚNIOR R.R.; VALÉRIO H.M.; BRAMDI I.V.; OLIVEIRA D.A. Antibacterial activity of tanins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, p.1-5, 2014.
- SILVA, A.G. Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. **Curr. Top. Phytochem.**, v.11, p.81-94, 2012.
- SIMÕES, C.M. O. 2003. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Santa Catarina: UFSC.
- SNEL, G.G.M.; MALVISI, M.; PILLA, R.; PICCININI, R. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.174, p. 489–495, 2014.
- VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública México**, v.47, p.381-387, 2005.
- WEBSTERS-ONLINE-DICTIONARY. **Tannin (tannic acid)**. Disponível em: <<http://www.websters-online-dictionary.org/tannin>>. Acesso em: 11 dez 2014.
- ZAR, J. H. 1999. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 663 p.