

# SIMEALI

II Simpósio de Engenharia  
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na  
produção de alimentos

## Eficácia *in vitro* do extrato etanólico de folhas de *Ziziphus joazeiro* contra bactérias isoladas de vacas com mastite como alternativa no controle da qualidade do leite

Márcia Farias Andrade\*<sup>1</sup>; Valdo Soares Martins Júnior<sup>2</sup>; Eduardo Robson Duarte<sup>3</sup>; Maximiliano Soares Pinto<sup>3</sup>; Franciellen Moraes Costa<sup>4</sup>, Gabriel Sthefano Lourenço Pereira<sup>1</sup>, Laura Fancielle Ferreira Borges<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduandos em Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>2</sup> Graduando em Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>3</sup> Docentes, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>4</sup> Doutora em Ciências. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Minas Gerais

\*Autor para correspondência: marciandrade7@hotmail.com

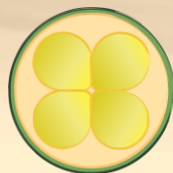
**RESUMO:** O leite é um alimento altamente relevante devido a sua composição rica em diversos nutrientes. A qualidade do mesmo é um grande obstáculo ao desenvolvimento da indústria de laticínios, sendo a mastite, o maior entrave na produção leiteira, tendo a *Staphylococcus aureus* como principal agente etiológico. Os extratos vegetais representam uma alternativa no controle de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais. Assim objetivou-se avaliar a eficácia do extrato etanólico de *Ziziphus joazeiro* contra cepas de *Staphylococcus spp.* e *Escherichia coli* isoladas de vacas com mastite. As folhas coletadas foram utilizadas a 15% para produção do extrato etanólico, e a avaliação do efeito inibitório foi realizado nas concentrações de 25% e 100% contra seis isolados. Discos de 5 mm de papel filtro foram imersos em cada diluição do extrato e adicionados em placas contendo ágar Mueller Hinton inoculado com as cepas bacterianas. Incubou-se as placas a 37°C durante 24 horas, para verificação dos diâmetros dos halos de inibição. Após observação dos resultados foi possível avaliar que o extrato não se mostrou eficaz em nenhuma das concentrações estudadas.

**Palavras-chave:** Leite. Mastite bovina. *Ziziphus joazeiro*. Atividade antimicrobiana.

## INTRODUÇÃO

Considerado como o mais nobre dos alimentos, o leite é rico em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas, além de suas propriedades nutricionais, o leite oferece elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura, como o ácido linoleico conjugado, esfingomiélna, ácido butírico,  $\beta$  caroteno, vitaminas A e D (MÜLLER, 2002). A solidificação da indústria de laticínios no Brasil é altamente dependente da qualidade da matéria prima que deve apresentar maior concentração de sólidos totais, e menor número de bactérias e células somáticas para obter rendimentos industriais superiores, aumento do prazo de validade e padronização dos produtos derivados. Os parâmetros de contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) permitem a quantificação de microrganismos que causam deterioração do leite e mastite aos animais, respectivamente (KLOSS et al., 2010).

Se tratando da qualidade do leite *in natura*, esta é influenciada por muitas variáveis, entre as quais destacam-se fatores associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e à todo processo relacionado à obtenção e armazenagem do leite. Uma das causas que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite,



# SIMEALI

II Simpósio de Engenharia  
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na  
produção de alimentos

é a mastite bovina que é um processo infeccioso e inflamatório da glândula mamária, que acarreta em modificação da composição do leite in natura com aumento da contagem de células somáticas (MUELLER, 2002).

Vários microrganismos podem ser causadores da mastite, sendo as bactérias o grupo mais abundante, entre os quais se destacam os agentes etiológicos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Escherichia coli*, leveduras e fungos (TRONCO, 2008).

Os microrganismos causadores da mastite podem ser classificados em agentes ambientais que são encontrados especialmente no ambiente que o animal vive e de forma oportunista invadem a glândula mamária causando imediata inflamação e os agentes contagiosos que tem como fonte principal o úbere, onde estão adeptos à multiplicação na glândula (SANTOS, 2007)

Um dos principais agentes causadores da mastite bovina é o *Staphylococcus aureus* que é a espécie mais importante dentro do gênero *Staphylococcus*, considerado o patógeno mais isolado de amostras de leite cru, tendo algumas cepas que produzem uma série de enterotoxinas de natureza proteica, altamente termorresistentes que ainda não tem seus mecanismos de ação totalmente conhecidos (SANTOS; FONSECA, 2007).

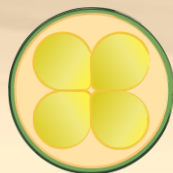
Se tratando de formas de controle das infecções estafilocócicas, podem ser destacadas o tratamento precoce de casos clínicos e a terapia de vacas secas (SANTOS; FONSECA, 2007). Em ambos os casos, é necessário conhecer o perfil de resistência dos isolados visando à escolha dos antimicrobianos mais adequados para as referidas terapias, uma vez que os perfis de resistência de *S. aureus* podem ser bastante variáveis entre rebanhos, e até mesmo dentro de um mesmo rebanho. Diversos estudos apontam que este agente, além de ser o mais frequentemente isolado da mastite bovina no Brasil, apresenta aumento crescente no padrão de resistência a antimicrobianos, o que ocorre devido a capacidade diferenciada em adquirir resistência (COSTA, 2013).

A *Escherichia coli*, muito comum na microbiota intestinal de homens e animais, que não é considerada um agente patogênico importante para bovinos, podendo ficar abrigados em animais sadios sem nenhuma manifestação de sintomas, mas, no entanto, algumas cepas de *E. coli* podem ser patogênicas, sendo responsáveis por sintomas típicos relacionados a toxinas, podendo ser causa de mastite ambiental (SANTOS; FONSECA, 2007)

Determinar a CCS no leite de animais individuais ou de tanque é uma ferramenta valiosa na avaliação do nível de mastite subclínica no rebanho, na estimativa das perdas quantitativas e qualitativas de produção do leite e derivados, como indicativo da qualidade do leite produzido na propriedade e como forma de formular medidas de prevenção da mastite (MUELLER, 2002). Adotar limites máximos para CCS dos leites é uma tendência mundial visando a busca pela maior qualidade e segurança do leite e conseqüentemente dos seus derivados, sendo que a presença elevada destes contaminantes afetam a composição da matéria prima e a sua vida de prateleira (TRONCO, 2008).

Com intuito de melhorar a eficiência no tratamento de mastite, faz-se necessário que além de detectar-se o agente infeccioso, seja feito o monitoramento do perfil de resistência aos antibióticos do isolado microbiano, para então estabelecer a escolha mais adequada do antimicrobiano a ser utilizado na terapia (MORITZ; MORITZ, 2017).

Além de adotar boas práticas para uma ordenha higiênica, apontada como método eficaz e de baixo custo para o controle e prevenção da mastite, vale ressaltar a importância do manejo juntamente à escolha adequada de um antimicrobiano eficaz para o tratamento de mastite, evitando a possibilidade de resistência microbiana no rebanho, tornando-se um risco a saúde humana e animal (MORITZ, 2017).



# SIMEALI

II Simpósio de Engenharia  
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na  
produção de alimentos

O uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores para a saúde humana e animal em função das falhas terapêuticas e aumento das taxas de resistência microbiana (COSTA et al., 2013). Assim torna-se necessário a busca por novas alternativas terapêuticas com maior eficácia e menor custo para o controle da mastite e de outras doenças que são consideradas com problema de saúde pública.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) desde a década de 90 vem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, objetivando avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e de conhecer, ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido (SOUSA, 1991). Sendo que a busca pela presença de substâncias antimicrobianas em plantas teve um grande impulso após a descoberta da penicilina.

Entre as plantas medicinais está o *Ziziphus joazeiro* (juazeiro), árvore frondosa com até 16 metros de altura, com tronco de 39 a 50 cm de diâmetro, cuja copa é mais larga do que alta. Suas folhas têm de 3 a 7 cm de comprimento, e as flores amarelo-esverdeadas. O fruto do tipo drupa, globoso, amarelado, com caroço grande, coberto por uma polpa mucilaginosa, branca e doce, nativa do Nordeste do Brasil, pode ser encontrada desde o Piauí até o sul de Minas Gerais (SOUSA, 1991).

As cascas do tronco e as folhas são tradicionalmente usadas na medicina popular do Nordeste, na forma de extrato feito com água, usado por via oral, para alívio de problemas gástricos e, externamente, para limpeza dos cabelos e dos dentes, sendo referido, inclusive, como tônico capilar, anticaspa e remédio útil nas doenças da pele (SOUSA et al., 1991).

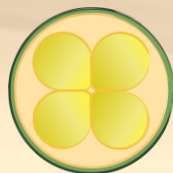
Desta forma, considerando a importância de se conhecer o potencial de plantas com finalidades terapêuticas e levando em conta os poucos estudos realizados, o presente trabalho teve como objetivo conhecer a atividade antimicrobiana do *Ziziphus joazeiro* contra os microrganismos patogênicos causadores da mastite bovina, com o intuito de desenvolver métodos de controle e qualidade do leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Ziziphus joazeiro* foram coletadas no mês de janeiro do ano de 2017 na zona rural de município de Caetitê no estado da Bahia. As mesmas foram selecionadas de acordo com a aparência, sendo descartadas as que apresentavam algum tipo de desgaste físico.

Após a seleção, foram desidratadas em estufa com circulação forçada de ar à 40 °C por 72 horas, moídas e utilizadas a 10 % m/v. Para o extrato etanólico, as folhas desidratadas e trituradas (150g), foram acondicionadas em recipientes de vidro âmbar acrescentando 1,5 L de etanol. O frasco fechado foi conservado em local escuro e em temperatura ambiente durante 7 dias. O extrato foi filtrado, em funil com algodão e gaze, distribuídos em 40 placas de petri e levado à estufa de circulação forçada de ar a 45°C por um período de 3 dias, para que ocorresse a volatilização do álcool, evitando assim que o mesmo viesse a mascarar possíveis efeitos do extrato. Quando secos foram raspados, armazenado livre da incidência de luz e conservado em temperatura de refrigeração. Algumas amostras foram submetidas à determinação de matéria seca (MS), a 105°C, para cálculo das concentrações a serem testadas.

O efeito inibitório foi avaliado nas concentrações a 150 mg/mL e 37,5 mg/mL (matéria seca) contra 3 isolados da bactéria *Escherichia coli* e 3 isolados de *S. aureus*. Discos de 5 mm de papel filtro foram embebidos em cada diluição do extrato e adicionados em placas contendo ágar Mueller Hinton inoculado com auxílio de swab com as cepas bacterianas. incubou-se a 37 °C por 24 horas para verificação e mensuração dos diâmetros dos halos de inibição (DHI). O experimento foi realizado em triplicata, em fatorial 5x6 representado por cinco concentrações e seis isolados.



# SIMEALI

II Simpósio de Engenharia  
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na  
produção de alimentos

Para a interpretação dos resultados foram seguidas as recomendações do National Committee of Clinical Laboratory Standards – NCCLS, onde os halos de inibição formados foram comparados com a tabela de referência, sendo os microrganismos classificados como resistente (zona de inibição inferior a 15 mm), intermediário (de 15 a 29 mm) e sensível (de 30 a 35 mm) a determinado agente (NCCLS, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico não apresentou eficácia na ação antimicrobiana, não havendo formação de halos de inibição em nenhuma das concentrações testadas sobre os isolados utilizados. Sendo assim o *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* foram classificados com resistentes ao extrato. Esta ineficácia pode ter ocorrido devido ao fato de ter sido utilizado somente as folhas e não outros componentes da planta.

Em estudo realizado por Silva et al. (2010) que analisou a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Ziziphus joazeiro*, por meio de uma investigação comparativa entre cascas e folhas contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, obteve como resultado, que o extrato com atividade mais expressiva foi o da casca, que inibiu 66,66% dos microrganismos, não havendo eficácia significativa do extrato utilizando folhas.

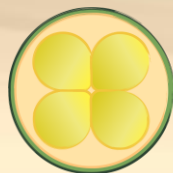
Ainda para Silva et al. (2010), a atividade antimicrobiana do extrato das cascas de juazeiro apresentou eficácia contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgares*, *Micrococcus luteus* e *Streptococcus pyogenes*, havendo semelhança com este estudo no sentido que para *Escherichia coli* os extratos de folhas e cascas não apresentaram inibição.

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível concluir que apesar de ser uma planta vastamente utilizada na área medicinal, cuja atividade antimicrobiana tem sido estudada e já comprovada para alguns microrganismos, o *Ziziphus joazeiro* não se mostrou eficaz na inibição de bactérias potencialmente causadoras da Mastite bovina, que é uma doença que interfere de forma negativa na qualidade do leite. Apesar da objetividade do estudo não ter sido alcançada, é notório que com base na sabedoria popular e em estudos científicos já realizados, o juazeiro apresenta grande potencial medicinal, sendo que efeitos significativos podem ser encontrados utilizando outras partes da planta.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Pró-Reitoria de Extensão - PROEXT, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e ao Ministério da Educação – MEC.



# SIMEALI

II Simpósio de Engenharia  
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na  
produção de alimentos

## REFERÊNCIAS

- COSTA, G. M. et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, jul. 2013.
- KLOSS, A. et al. Leite Bovino. **In: OHI, M. (ed.) Princípios básicos para produção de leite bovino**. Curitiba: UFPR, 2010, p. 100-116.
- MORITZ, F.; MORITZ, C. M. F. Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. associados à mastite bovina. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, Umuarama, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2017.
- MULLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, v. 2, n. 2, p. 206-217, 2002.
- NATIONAL COMMITTEE OF CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests**. Wayne, 2000.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1 ed. São Paulo: Ed. dos Autores, 2007. 314 p.
- SILVA, T. C. L. et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 193-199. 2010.
- SOUSA, M. P. et al. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Imprensa universitária. 2 ed. Fortaleza: UFC, 1991. 448 p.
- TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206 p.