

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

Antimicrobial activity of *Schinus terebenthifolius* Raddi

Cláudia Helena Degáspari¹, Nina Waszczynskyj², Maria Rosa Machado Prado³

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho analisar a atividade antimicrobiana de extratos aquoso e alcoólico obtidos de frutos da *Schinus terebenthifolius* ou aroeira-vermelha, diretamente ligados à quantidade de compostos fenólicos existentes nesses extratos. Pelos testes, verificou-se que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, já o extrato aquoso não apresentou efeito inibitório sobre os crescimento dos microrganismos testados. O extrato alcoólico mostrou-se com quantidade significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico, ao passo que no extrato aquoso foi observada a presença da flavanona naringina.

Termos para indexação: Atividade antimicrobiana, Compostos fenólicos, *Schinus terebenthifolius*.

ABSTRACT

This research analyzed the antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts obtained from *Schinus terebenthifolius* fruits or aroeira-vermelha, directly linked to the amount of phenolics compounds existent in these extracts. The tests showed that the alcoholic extract presented an inhibitory effect to the growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, and the aqueous extract didn't present inhibitory effect to the growth of the tested microorganisms. The alcoholic extract was shown with a significant amount of the flavone apigenin, besides ellagic acid and siringic acid, while in the aqueous extract was observed the flavanone naringine.

Index terms: Antimicrobial activity, Phenolics compounds, *Schinus terebenthifolius*.

(Recebido para publicação em 26 de julho de 2004 e aprovado em 10 de março de 2005)

INTRODUÇÃO

A *Schinus terebenthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira-vermelha, é uma árvore de folhas perenes, originária da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois tornam-se vermelhos. Essa casca vermelha seca, transformando-se em uma espécie de concha de papel, que envolve a semente. A semente é única, marrom-escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (BORNHAUSEN, 2002; USP, 2002).

Esse pequeno fruto inscreve-se entre as muitas especiarias existentes e que são utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária mundial. O sabor suave e levemente picante do fruto da aroeira-vermelha, bem como sua bonita aparência, de uso decorativo, permite o seu emprego em diversas preparações, podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos. No entanto, a aroeira é especialmente apropriada para a confecção de molhos que

acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, por não sobrepor o seu gosto sutil (USP, 2002).

As partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais são: casca, folhas e frutos. É considerada pela medicina popular como adstringente, anti-diarréica, anti-inflamatória, depurativa, diurética e febrífuga. Não é utilizada como componente para cosmetologia. Devido à composição de seus óleos essenciais, é usada no tratamento de distúrbios respiratórios. Popularmente, é empregada no tratamento da diarreia, inflamações, para promover a transpiração e a eliminação de líquidos. A casca da aroeira tem ação contra febre, hemoptises e afecções uterinas, em geral. Da casca, extrai-se óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (BORNHAUSEN, 2002).

A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar agentes antimicrobianos naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico tem aumentado consideravelmente, com o intuito de promover ação sinérgica com conservantes químicos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese (RAUHA et al., 2000).

1. Engenheira de Alimentos, M.Sc., Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – Rua Com. Fontana, 405/803 – 80030-070 – Curitiba, PR – claudia.degaspari@utp.br
2. Engenheira Química, D.Sc., Professora Titular no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná – 81531-990 – Curitiba, PR.
3. Farmacêutica-Bioquímica, M.Sc., Professora Adjunto do Curso de Nutrição – Universidade Tuiuti do Paraná – 80710-250 – Curitiba, PR.

A deterioração de alimentos por origem microbiana é um problema constante nas indústrias alimentícias. Para contornar esse problema, os fabricantes têm que se utilizar de aditivos do tipo conservantes, com o intuito de conservar melhor e aumentar o prazo de validade de produtos alimentícios. Por outro lado, os consumidores tendem a evitar produtos que apresentem em sua composição esses conservantes de origem química devido aos seus problemas de toxicidade (RAUHA et al., 2000).

Na natureza, existem diversos tipos de substâncias antimicrobianas (fitoalexinas) que desempenham um importante papel na defesa de seres vivos. Este estudo está baseado nas fitoalexinas fenólicas, isto é, os flavonóides, que são metabólitos secundários de plantas. Como substâncias dietéticas, são largamente conhecidos como antioxidantes que inibem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reduzindo a tendência de trombose (MERCIER, 1997; RAUHA et al., 2000).

Neste trabalho tem-se como objetivo geral a análise do fruto da aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) no que diz respeito às suas propriedades antimicrobianas para uso em produtos alimentícios com relação aos compostos fenólicos em extratos alcoólico e aquoso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico e obtenção dos extratos

A atividade e a concentração de antioxidantes fenólicos em frutos de aroeira foram estudadas neste trabalho. Os frutos obtidos foram cuidadosamente selecionados, evitando-se o topo e as partes mais baixas da árvore. A colheita ocorreu no mês de fevereiro de 2004 (período de frutificação de janeiro a junho), a partir de um exemplar da *Schinus terebenthifolius* Raddi já adulta, situada em latitude sul 25° 25' 36,8" , longitude oeste 49° 17' 51,0" e altitude de 892 metros (Curitiba-PR-Brasil). O material colhido foi limpo de sujidades, sendo selecionados apenas os frutos maduros com coloração variando do rosa ao vermelho. Os frutos verdes foram descartados.

Os frutos foram secos em estufa comum (sem ventilação) numa temperatura de 50 °C por 96 horas até a redução total da umidade (umidade inicial de 39%). Após a secagem, obteve-se um total de 300 g de material seco. Os frutos secos foram moídos em moinho microtriturador (IKA Labortecnik) até a granulometria aproximada de 32 mesh. Após moídos, esses foram submetidos à extração com éter etílico em aparelho

Soxhlet (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), visando à retirada de substâncias lipídicas (teor de lipídios da fruta de 15% em base seca ou 12% base úmida) (BIRCH et al., 2001).

Após evaporação do éter (ao ar livre em capela), a amostra foi dividida em duas partes distintas e iguais de 150 g, e partiu-se para a extração dos compostos fenólicos com dois solventes distintos: etanol absoluto PA (99,7% de pureza) e água deionizada. Para a extração com etanol, 3 porções de 50 g de amostra foram adicionadas a 400 mL do solvente e mantidos sob agitação orbital por 1 hora, numa temperatura de 20 °C. Decorrido esse tempo de extração, reuniram-se as amostras, filtrando-se a vácuo (5 mm Hg), obtendo-se o extrato alcoólico. Para o extrato aquoso, 3 amostras de 50 g foram adicionadas de 400 mL de água a 50°C cada uma e mantidas sob agitação orbital com banho-maria a 50°C por 1 hora. Decorrido esse tempo de extração, reuniram-se as amostras, peneirando-as em peneiras de 32 mesh (para retirar o material mais grosso), centrifugando por 20 minutos a 3.000 rpm (força centrífuga relativa de 7 g) para retirar o material mais fino, filtrando-as a vácuo (5 mm Hg) para retirar o sobrenadante final, obtendo-se o extrato aquoso (BURNS et al., 2001; CORDENUNSI et al., 2002; KÄHKÖNEN et al., 2001; YILDIRIM et al., 2001; ZHENG & WANG, 2001).

Do extrato alcoólico obtido, o etanol foi removido em evaporador rotatório (T < 50 °C), (Fisatom) para obtenção do extrato seco, que foi diluído em 7 mL de metanol. O extrato aquoso foi liofilizado (Ilshin Lab Co.) numa pressão de 5 mm Hg e T = -50°C, diluído em 30 mL de metanol e filtrado a vácuo (5 mm Hg). O extrato alcoólico e o extrato aquoso, ambos diluídos em metanol, foram mantidos estocado em freezer vertical numa temperatura de -18 °C, até o momento de utilização nas análises (SLUIS et al., 2001).

Determinação de compostos fenólicos totais

Foi utilizado 0,25 mL dos extratos obtidos ou da diluição adequada deles e adicionados 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo os tubos colocados em banho-maria a 37°C durante 30 minutos para desenvolvimento de cor. As leituras das absorbância foram realizadas a 750 nm e os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina por g de amostra (b.u.) (GENOVESE et al., 2003; ZIELISKI & KOZOWSKA, 2000).

Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Foi utilizado cromatógrafo de fase reversa HP 1100 acoplado a detector de varredura por diodo. A coluna utilizada foi a Prodigy 5 μ ODS3 com fase reversa de sílica (250 mm x 4,6 mm, Phenomenex) e os solventes de eluição foram (A) água/tetrahidrofurano/ ácido trifluoracético 98:2:0,1 e (B) acetonitrila. As amostras foram injetadas em duplicata. A calibração foi feita injetando os padrões 3 vezes a 4 concentrações diferentes (CORDENUNSI et al., 2002).

Testes microbiológicos

Os testes foram realizados com microrganismos fornecidos pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos) da Universidade Federal do Paraná. Esses foram: uma levedura (*Candida albicans* ATCC 10231) e um fungo (*Aspergillus niger* ATCC 16404) e 5 cepas bacterianas (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145).

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes dos microrganismos-teste, preparando-se suspensões padronizadas pela densidade ótica de 0,45 de absorvância em comprimento de onda de 450 nm, com uma concentração de 10⁸ células/mL (THE UNITED..., 2000).

Para analisar a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólico e aquoso dos frutos da aroeira, foi utilizado o método de difusão em disco de papel (com 6 mm de diâmetro) no meio gelosado Müller Hinton (para as bactérias) e meio PDA (para a levedura e fungo). As suspensões dos microrganismos-teste foram semeadas na superfície do meio, em placas de Petri, com o auxílio de alça de Drigalsky (100 μ L/placa igual a 10⁷ células). Foram utilizados discos de 6 mm de diâmetro, embebidos com 20 μ L de solução a 100 mg/mL dos extratos em estudo. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas 3 repetições. O teste-controle foi realizado com os discos embebidos com o agente diluente dos extratos no caso metanol (CARVALHO et al., 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção dos extratos contendo os compostos fenólicos dos frutos da aroeira, coletaram-se os frutos das partes medianas da árvore (evitando o topo e as partes mais baixas). Esse procedimento foi adotado pelo fato de que a concentração total de flavonóides é muito menor na ausência de luz. Para a extração dos compostos fenólicos, adotaram-se duas metodologias distintas: extração com água quente e extração com etanol absoluto. Essas duas substâncias empregadas na extração foram escolhidas, em vez do metanol, que é o solvente mais indicado, para evitar que possível resíduo da substância extratora pudesse interferir no grau de pureza do extrato final, que poderá ser empregado como aditivo alimentício futuramente.

A extração com água quente envolveu diversas etapas de separação até se conseguir um extrato aceitável, quando comparada à extração feita com etanol. Após o aquecimento em água a 50°C, a amostra foi peneirada, centrifugada e posteriormente filtrada, até se chegar ao extrato final. Já a amostra extraída com etanol, após a extração, sofreu apenas um processo de filtração. Assim sendo, a extração com água seria mais dispendiosa em termos de processo, visto que envolveria maior número de operações unitárias, quando comparada à extração com etanol.

Com relação à quantificação dos compostos fenólicos, esses foram determinados como catequina equivalente, usando a seguinte equação linear baseada na curva de calibração:

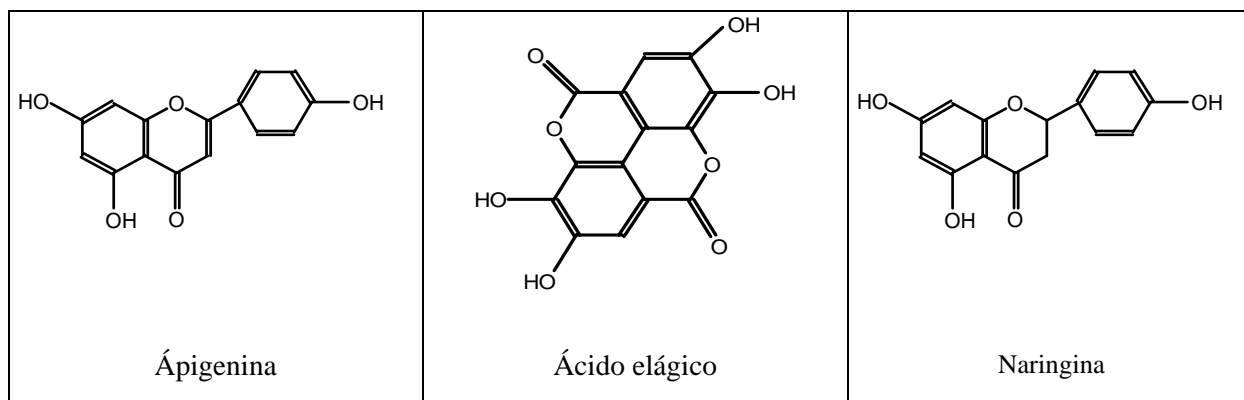
$$Y = 42,426 X + 61,262, \quad R^2 = 0,999$$

Em que: Y é a absorvância e X, o equivalente de catequina (μ g/mL de extrato).

Encontraram-se um total de 88 μ g de catequina/g de amostra base seca para o extrato aquoso e 685 μ g de catequina/g de amostra para o extrato alcoólico. Comparando-se com os dados de literatura (CORDENUNSI et al., 2002), observou-se que, com relação à quantidade de compostos fenólicos do morango (fruta base úmida), os frutos da aroeira apresentam de 94% a 97% menos compostos fenólicos, quando se analisa o extrato aquoso. Já o extrato alcoólico mostrou-se com 77% a 57% menos compostos fenólicos, ou seja, os frutos da aroeira apresentam pouca quantidade de compostos fenólicos. Isso poderia ser um indício de que talvez não valesse a pena sua extração.

Com relação à análise de HPLC, verificou-se que a amostra obtida a partir do extrato alcoólico apresentou uma quantidade significativa da flavona apigenina (vide estrutura química na FIGURA 1) (quatro picos) nos tempos de retenção de 25 a 27 minutos, o que justifica a sua coloração amarelada. Apresentou também um pico de ácido elágico (vide estrutura química na FIGURA 01) no tempo de retenção de 14 minutos, conforme exibido na Figura 2.

Já na amostra obtida a partir do extrato aquoso, foi encontrada uma pequena quantidade da flavanona naringina (vide Figura 01) no tempo de retenção de 26 minutos, conforme exibido na Figura 3; concluindo-se que essa baixa quantidade encontrada pode ser devida à instabilidade dos flavonóides em água, por serem facilmente hidrolisados. Com esses dados, infere-se que o melhor solvente de extração para a aroeira é o etanol ou metanol.



FONTE: Bobbio & Bobbio (1989).

FIGURA 1 – Estruturas químicas básicas dos taninos hidrolisáveis.

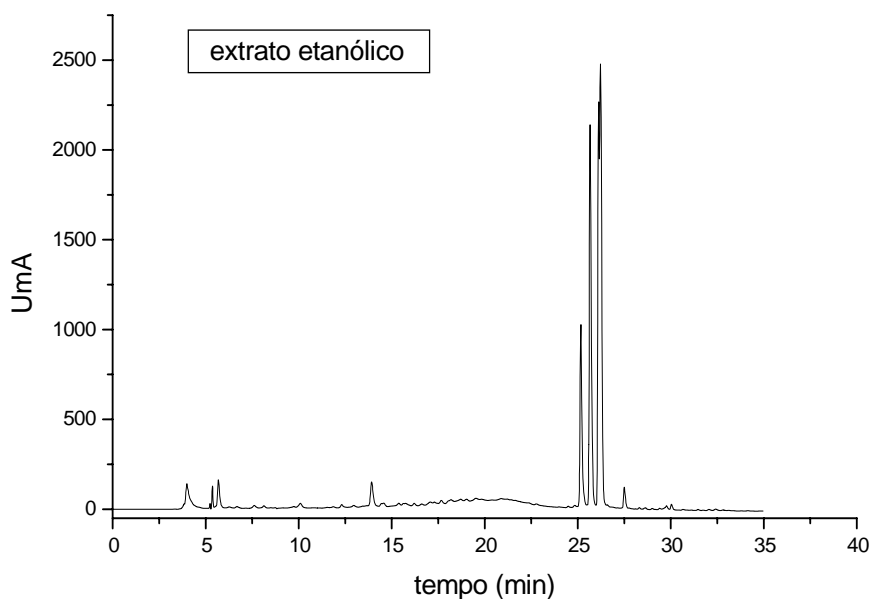


FIGURA 2 – Análise pelo HPLC do extrato alcoólico.

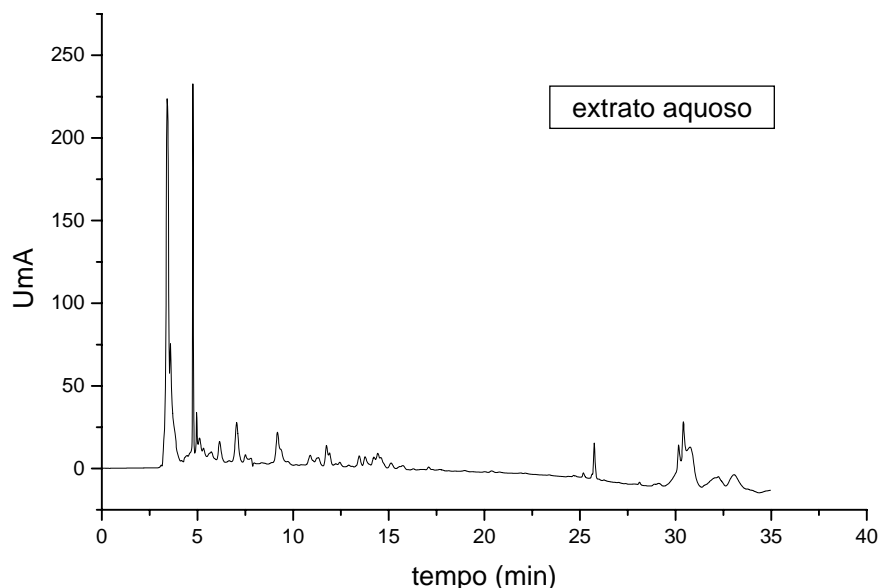


FIGURA 3 – Análise pelo HPLC do extrato aquoso.

Na análise microbiológica, verificou-se que entre as cepas analisadas, as do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e do *Bacillus cereus* ATCC 11778 apresentaram-se sensíveis à ação antimicrobiana do extrato alcoólico, sendo os halos de inibição de 9 mm para o *Staphylococcus aureus* e de 11 mm para o *Bacillus cereus*. Quanto às outras cepas testadas, não foram observados halos de inibição produzidos devido à atividade antimicrobiana do extrato. De acordo com a determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu, a quantidade de compostos fenólicos do extrato alcoólico impregnado no disco foi de 197,52 µg equivalentes de catequina.

Já o extrato aquoso não apresentou poder inibitório em nenhuma das cepas testadas, não sendo observado halos inibitórios em nenhuma das placas produzidas. A quantidade de compostos fenólicos do extrato aquoso impregnado no disco foi de 14,65 µg equivalentes de catequina. Provavelmente a quantidade aplicada do extrato não tenha sido suficiente para promover a ação inibitória.

De acordo com a literatura consultada (RAUHA et al., 2000), uma amostra de flavona empregada (concentração de 500 µg) apresentou ação antibacteriana,

entre as cepas testadas, para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, os resultados foram compatíveis com relação à ação inibitória para o *Staphylococcus aureus*, mas não compatível à *Escherichia coli*. Nesse caso, infere-se que a cepa de *Escherichia coli* utilizada seja resistente à ação inibitória do extrato, visto que ambas as cepas são diferentes.

CONCLUSÃO

Os frutos da *Schinus terebenthifolius* ou aroeira-vermelha apresentam baixo teor de compostos fenólicos, quando comparados a outros vegetais já estudados. O extrato alcoólico mostrou-se com uma quantidade significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico. Com relação à sua ação antimicrobiana, observou-se que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e do *Bacillus cereus* ATCC 11778, mas sem efeito inibitório para as outras cepas testadas. O extrato aquoso não apresentou efeito inibitório aos microrganismos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRCH, A. E.; FENNER, G. P.; WATKINS, R.; BOYD, L. C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 4502-4507, 2001.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1989.
- BORNHAUSEN, R. **Ervas do sítio**. Disponível em: <<http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Acesso em: 24 jan. 2002.
- BURNS, J. et al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 5797-5808, 2001.
- CARVALHO, A. A. T. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 4, p. 255-8, 2002.
- CORDENUNSI, B. R. et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.
- GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 167-169, 2003.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: O Instituto, 1985. v. 1.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 4076-4082, 2001.
- MERCIER, J. Role of phytoalexins and other antimicrobial compounds from fruits and vegetables in postharvest disease resistance. In: TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ROBINS, R. J. **Phytochemistry of fruit and vegetables**. Oxford: Clarendon, 1997. p. 221-241.
- RAUHA, J. P. et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.
- SLUIS, A. A. et al. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 3606-3613, 2001.
- THE UNITED States Pharmacopeia & The National Formulary. 24. ed. Washington: United State Pharmacopeial Convention, 2000.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Biblioteca virtual do estudante brasileiro: aroeira**. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/acervo/paradidat/frutas/aroeria/aroeria.html>>. Acesso em: 24 jan. 2002.
- YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 4083-4089, 2001.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 5165-5170, 2001.
- ZIELISKI, H.; KOZOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 48, p. 2008-2016, 2000.