

Composição Química e Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Óleo de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius*)

Carvalho, J. A. M.^{1*}; Pinheiro, P. F.¹; Marques, C. S.²; Bastos, L. R.²; Bernardes, P. C.³

¹ Departamento de Química e Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.

³ Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.

* e-mail: guto_tk22@hotmail.com

Resumo

O óleo essencial de frutos da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) foi obtido por hidrodestilação com rendimento de 5,3% (m/m) em relação à massa seca dos frutos. Os constituintes do óleo foram analisados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama e espectrometria de massas (CG-DIC e CG-EM) e os componentes majoritários encontrados foram: delta-3-careno (40,53%), silvestreno (17,63%), beta-felandreno (14,25%), e alfa-pineno (11,90%). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius* foi avaliada pelo teste de difusão em ágar realizado em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para *S. aureus*, observou-se pequeno halo de inibição (9,17 mm) comparado com os antibióticos (ampicilina: 35,00 mm; tetraciclina: 29,17 mm). Em relação à bactéria, *E. coli* não foi observada formação de halo de inibição, não apresentando atividade antimicrobiana contra essa bactéria. Mais estudos acerca desse óleo essencial são necessários para verificar sua atividade antimicrobiana.

Abstract

The essential oil from the fruit of *Schinus terebinthifolius* (pink pepper) was obtained by hydrodistillation, showing a yield of 5,3% (m/m) according the dry matter content of the fruits. The composition of the essential oil was analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC/FID) and gas chromatography combined with mass spectrometer (GC/MS). The main compounds identified were: delta-3-carene (40,53%), sylvestrene (17,63%), beta-phellandrene (14,25%), e alpha-pinene (11,90%). The essential oil antimicrobial activity was investigated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using the agar well diffusion method. Against *S. aureus*, the essential oil showed a small inhibition zone (9,17 mm) when compared with antibiotics (ampicilin: 35 mm; tetracycline: 29,17 mm). No activity was observed against *E. coli*. More studies are necessary to verify the antimicrobial activity of the essential oil obtained from *S. terebinthifolius*.

Keywords: essential oil, gas chromatography, antimicrobial activity

1. Introdução

Óleos essenciais são constituintes voláteis, que podem estar presentes em várias partes das plantas, tais como: folhas, flores, frutos, raízes e rizomas. Esses compostos são odoríferos, de caráter lipofílico e, no processo de hidrodestilação, separam-se da água por diferenças de polaridade e densidade¹.

Atualmente, existe uma grande tendência em utilizar os óleos essenciais em diversos setores industriais, como por exemplo: em perfumaria, cosméticos, aromatizante e produtos de limpeza. Devido a presença de compostos que têm atividade antibacteriana e antifúngica, diversos óleos essenciais vêm sendo cada vez mais aplicados pelas indústrias farmacêutica, na produção de medicamentos, e pelos setores agrícolas, no desenvolvimento de pesticidas naturais. Além disso, a ação antimicrobiana dos óleos essenciais também vem sendo bastante explorada para a elaboração de sanitizantes e produtos de limpeza e higiene².

Por possuírem uma gama de importantes compostos voláteis em sua constituição, o processo de extração de óleos essenciais mais utilizado é a hidrodestilação. Em temperatura elevada, os compostos presentes na planta são arrastados pelo vapor de água, e a mistura formada retorna à fase líquida ao passar por condensadores. Durante a coleta, observa-se formação de duas fases: uma fase aquosa (hidrolato); e uma fase oleosa. É possível que no hidrolato estejam presentes alguns constituintes orgânicos, que apresentam solubilidade em água. A extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos é uma forma de se recuperar essas substâncias presentes no hidrolato e que, antes, encontravam-se em fase aquosa. Dentre os demais possíveis métodos de extração, destacam-se: enfloração; extração com solventes orgânicos; extração com fluido supercrítico; prensagem a frio; arraste a vapor; extração com ultrassom; extração com micro-ondas. As características da planta, a fonte de óleo essencial (flor, folha, semente, raiz), o destino desse óleo e o composto que se deseja obter definem o tipo de extração a ser aplicada³.

No presente estudo, realizou-se extração do óleo essencial do fruto de *Schinus terebinthifolius* Raddi, planta pertencente à família *Anacardiaceae*, conhecida popularmente como Aroeira. Árvore de porte mediano, nativa da América do Sul e do Brasil, pode ser encontrada desde o nordeste até o sul do país. Possui fruto pequeno e avermelhado, conhecido comumente por pimenta rosa e de grande uso popular⁴. Esses frutos despertaram a curiosidade de análises como composição química do óleo, umidade da planta e rendimento. Essas são três análises de grande importância, uma vez que, por meio da composição química, é possível identificar os compostos majoritários presentes no óleo essencial extraído e, assim, qual teste se pode aplicar para planta. A umidade revela o quanto de água presente na planta, e através dessa diferença de massa calcular o rendimento da quantidade de óleo extraído.⁵

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar o óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* e testá-lo sobre duas bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, por meio de teste de difusão em ágar.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta do material e extração do óleo essencial

Os frutos de *Schinus terebinthifolius* foram coletadas pela manhã em Alegre, ES, Brasil, e divididos em três porções de 300 g, que foram submetidas à extração. Realizou-se a hidrodestilação das amostras, por três horas consecutivas, utilizando aparelho do tipo Clevenger.⁶

Após a hidrodestilação, o hidrolato obtido para os frutos da *S. terebinthifolius* foi centrifugado a 5000 RPM (rotação por minuto), durante 5 minutos, de forma a promover a separação entre as fases aquosa e oleosa. Com o auxílio de uma pipeta Pauster, o óleo (sobrenadante) foi retirado e armazenado em frasco âmbar em freezer a -4°C⁷.

2.2. Composição Química dos óleos essenciais

2.2.1. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

O óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), em equipamento com detector seletivo de massa, modelo QP-PLUS-2010 (Shimadzu). A coluna cromatográfica utilizada foi a do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária Rtx-5MS, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás de arraste. As temperaturas utilizadas foram de 220 °C no injetor e 300 °C no detector. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, sendo programada para ter acréscimos de 3°C a cada minuto, até atingir a temperatura máxima de 240°C. Uma quantidade de 10 mg do referido óleo essencial foi diluída em 1 mL de diclorometano, sendo injetado 1 µL da mistura. Uma mistura de alcanos lineares (C₉ a C₂₆) foi injetada no cromatógrafo nas mesmas condições usadas nas análises do óleo essencial para os cálculos do Índice de Kovats (IK)⁸.

Os constituintes do óleo essencial do fruto da *S. terebinthifolius* foram identificados pela comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros de massas existentes no banco de dados do equipamento (Wiley7), também pela comparação dos valores dos Índices de Kovats (KI) calculados com os valores tabelados⁹, e ainda pelos dados da literatura¹⁰.

2.2.2. Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC)

Para quantificar os compostos, o óleo essencial foi analisado em um cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC) CG-2010 Plus (Shimadzu). A fase estacionária usada foi a coluna capilar Rtx-5MS (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). O nitrogênio foi usado como gás de arraste. A programação de temperatura no forno foi a já

relatada para as análises em CG-EM. A temperatura do injetor foi de 240 °C e do detector foi de 250 °C. Uma amostra de 10 mg do óleo essencial foi diluída em 1 mL de diclorometano, sendo injetado 1 µL da mistura.⁸

2.3. Análise microbiológica

2.3.1. Microrganismos

A investigação do efeito antimicrobiano do óleo essencial foi realizada em bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e em bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 11229), ambas fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos.

2.3.2. Preparo do inóculo e teste de difusão em ágar

As bactérias foram ativadas consecutivamente em BHI (*Brain Heart Infusion*) e estriadas em ágar padrão para contagem, a partir do qual obteve-se os inóculos, preparando, em solução salina 0,85%, suspensões de turvação equivalente ao padrão de McFarland 0,5. Um volume de 20 mL de ágar Müller-Hinton foi vertido em placas de petri. Orifícios de 6,0 mm de diâmetro foram feitos no ágar sólido e, com um auxílio de um *swab*, aplicou-se o inóculo sobre toda superfície do meio já seco. Em seguida, alíquotas de 5 µL do óleo essencial puro foram adicionadas aos orifícios. Alíquota de 5 µL de água foi utilizada como controle negativo e tetraciclina e ampicilina foram os antibióticos padrões. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas, e os halos formados foram medidos¹¹.

A análise foi realizada em duplicada¹², com três repetições. Procedeu-se análise de variância (ANOVA) e teste de média de Tukey, a 5% de significância, utilizando programa estatístico Genes¹³.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição e identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *S. terebinthifolius*.

O rendimento do óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius* foi calculado em base seca e foi de 5,3% (m m^{-1}), segundo a literatura para hidrodestilação o rendimento para o óleo essencial de *S. terebinthifolius* foi entre 5,6¹⁴.

O teor de óleo essencial na planta pode estar associado a diversos fatores, tais como: temperatura, luminosidade, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, horário da colheita e nutrição da planta. Outros fatores também podem influenciar na quantidade e composição química do óleo essencial, como: as interações da planta com outras plantas, com microorganismos e insetos.¹⁵

Os componentes químicos encontrados no óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius* foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius*. T.R. = tempo de retenção (min.), NI = não identificado, IK = Índice de Kovats⁹, as porcentagens das áreas foram obtidas no GC-FID (Rtx-5MS column).

T.R (min)	Componentes	IK cal	IK tab.	Área (%)
8,764	Alfa-Tujeno	928,68	931	0,18
9,049	Alfa-Pineno	935,86	939	11,9
10,778	NI	974,20		0,1
10,862	Beta-Pineno	975,87	980	1,6
11,719	Mirceno	992,11	991	5,65
12,279	Beta-Felandreno	1002,87	1031	14,25
12,614	Delta-3-Careno	1011,07	1011	40,52
13,196	Cimeno	1024,73	1022	2,98
13,463	Silvestreno	1030,77	1027	17,63
16,282	NI	1087,28		1,23
31,807	Z-Cariofileno	1416,19	1404	1,51
34,491	Gama-muroleno	1479,34	1477	1,41
36,281	Delta-Cadineno	1522,03	1524	0,48

No presente estudo o óleo da *S. terebinthifolius* apresentou como compostos majoritários os compostos: delta-3-careno (40,5%), silvestreno (17,63%), seguido de beta-felandreno (14,2%) e alfa-

Pineno (11,9%). Ribeiro¹⁰, identificou no óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius* os compostos majoritários: delta-careno (42,3%) e beta-felandreno (14,8%). Da mesma forma, Clemente⁵, revelou como componente majoritário o delta-careno e beta-felandreno para o referido óleo. O delta-careno (40,52%) foi encontrado como constituinte majoritário em óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* coletados na região de Alegre-ES.

O óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* apresentou uma gama de bioatividade. Estes resultados são corroborados pelo trabalho de Ribeiro¹⁰, o qual relatou que esse óleo tem atividade antimicrobiana e fungicida, e de Roveda¹⁶, que determinou sua atividade antitumoral.

3.2. Atividade antimicrobiana

Os halos obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias dos diâmetros (mm) dos halos de inibição para o óleo essencial de *S. terebinthifolius* em *S. aureus* e *E. coli*. Ampicilina e Tetraciclina como antibióticos controle.

Microrganismo	Halo de Inibição* (mm)		
	Óleo essencial	Ampicilina	Tetraciclina
<i>S. aureus</i>	9,17c	35,00a	29,17b
<i>E. coli</i>	**	21,40b	27,00a

Médias de três repetições. Pares de médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

*Área de inibição incluindo orifício de 6 mm.

**Medição não foi possível devido a não observação de halo.

O halo observado em *S. aureus* para o óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolius* diferiu significativamente dos halos formados pelos antibióticos, possuindo o menor valor (9,17 mm). Entretanto, vale ressaltar que, mesmo com um halo relativamente pequeno, o óleo essencial ainda assim apresentou atividade antimicrobiana contra essa bactéria, o que representa um importante achado. As pequenas concentrações de alfa-pineno em sua composição podem justificar essa atividade antimicrobiana¹⁷.

Para *E. coli*, não foi observada formação de halo de inibição, indicando que o óleo essencial obtido nas

condições da pesquisa não apresentou efeito antimicrobiano contra essa bactéria.

A fim de se concluir a respeito de sua atividade antimicrobiana, sugere-se uma maior investigação não apenas contra espécies de bactérias, mas também contra fungos e leveduras.

4. Conclusões

A extração do óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius* da região de Alegre-ES apresentou um ótimo rendimento (5,3% em relação à massa seca dos frutos). Os constituintes majoritários encontrados foram: delta-3-careno; silvestreno; beta-felandreno; e alfa-pineno. O óleo essencial apresentou ação antimicrobiana contra a bactéria patogênica *S. aureus*. A extração do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* é uma opção interessante e pode agregar valor à cadeia produtiva da pimenta rosa.

5. Referências

- [1] GRUFFAT, X. CRIASAUDE: Óleos essenciais SP, fevereiro de 2016. Disponível em: <http://www.criasaude.com.br/N5960/fitoterapia/oleos-essenciais.html> acesso em: 05 de setembro de 2016
- [2] EL ASBAHANI, A. *et al.*, Int. J. Pharmaceut., v. 483, p. 220-243, 2015.
- [3] BRASIL. 2007. ABIMA, Resolução nº. 2, de 15 de janeiro de 2007 as 20h.
- [4] BRANCO NETO, L. M. C. *et al.*, Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 21, p. 17-22, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/acb/v21s2/32158.pdf> Acesso em 22 de setembro de 2016.
- [5] CLEMENTE, A.D. LOCUS UFV: Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 63f. Tese (Pós-Graduação em Agroquímica), Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- [6] PINHEIRO, P. F. *et al.*, Chemical Characterization and Toxicity of Citronella Grass Essential Oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 37, p. 138-144, 2013.
- [7] LIMA, R. K. *et al.*, Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). *Acta amazônica*, v. 39, n. 2, p. 377-382, 2009.
- [8] PINHEIRO, P. F. *et al.*, Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 41, 8981-8990. 2015.
- [9] ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (No. Ed. 4). *Allured publishing corporation*. 2007.
- [10] RIBEIRO, A. C. Efeito da adição de óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) micro encapsulado em queijo minas frescal. Alegre-ES. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.
- [11] NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—8th Ed. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). Wayne, Pa. 2003.
- [12] DOWNES, F.P.; ITO, K.. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: American Public Health Association - APHA, 2001
- [13] CRUZ, C.D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v.35, n.3, p.271-276, 2013
- [14] NICOLINI, J. V. COBEQI: Avaliação da eficiência de extração de óleo essencial de *Schinus Terebinthifolius* Raddi (Aroeira vermelha) pelos métodos de hidrodestilação e arraste a vapor. Aracruz-ES. Disponível em: <http://www.cobeqic2009.feq.ufu.br/uploads/media/99317061.pdf>, acessado 22 de setembro de 2016 as 14h.
- [15] [Moraes, L. A. S. *Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais*. Horticultura Brasileira, v. 27, p. 4050-4063, 2009.]
- [16] ROVEDA, L.M. Composição química e atividade antitumoral o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (ANACARDIACEAE). Mato Grosso do Sul. Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cach e:http://japao.org.br/simposio2010/wp-content/uploads/2010/PA013.pdf&gws_rd=cr&ei=VN_jV7-ZL4mrwATCuAAABA, acesso 22 de setembro de 2016
- [17] LEITE, A. M. *et al.*, Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n1/14.pdf> Acesso em 22 de setembro 2016.