

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA  
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**ANA PAULA GUERRA**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO  
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS  
FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2014**

ANA PAULA GUERRA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS  
DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Professor Orientador: Diogo Mauricio Betiolo

PATO BRANCO  
2014

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

O trabalho de diplomação intitulado **OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **2.13/2013-B** de 2014.

Fizeram parte da banca os professores.

Prof. Diogo Mauricio Betiolo

Prof. Dra. Sirlei Dias Teixeira

Prof. Dr.Vanderlei Aparecido de Lima

## RESUMO

GUERRA, Ana Paula. Obtenção e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Schinus Terebenthifolius* Raddi (aroeira) e determinação da atividade antimicrobiana. 34 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Pato Branco, 2014.

A utilização de plantas com finalidade terapêutica é uma tradição medicinal entre povos de várias culturas. Nestas, destaca-se o uso no tratamento de infecções, feridas, doenças venéreas, entre outras. A espécie *Schinus* é caracterizada pelo óleo essencial de cheiro pungente, concentrado principalmente nos frutos, que são utilizados no tratamento de distúrbios respiratórios, micoses e infecções. Os óleos essenciais são matérias primas vegetais amplamente utilizadas em diversos setores industriais, como perfumaria, cosméticos, higiene, alimentos, fármacos, entre outros. Uma das técnicas amplamente utilizada na extração de óleo essencial é a hidrodestilação a qual consiste em destilar ou levar à ebulição a amostra vegetal em aparelho Clevenger com água. O objetivo deste trabalho foi realizar a extração do óleo essencial de *Schinus terebenthifolius* Raddi via hidrodestilação, caracterizar quimicamente o óleo essencial e avaliar seu potencial antimicrobiano. O material botânico (folhas) foi coletado na cidade de Pato Branco - PR, e suas folhas foram secas e armazenadas. O óleo essencial foi extraído pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger. O óleo coletado foi caracterizado através de CG/EM e também utilizado para bioensaios contra as seguintes espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypimurium*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. Quanto a sua composição, os óleos essenciais majoritários extraídos de folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira) foram: isocitral,  $\gamma$ -macrocarpeno e  $\beta$ -ocimeno. Obteve-se resultados positivos para inibição em quatro dos cinco micro-organismos testados.

**Palavras-chave:** *Schinus Terebenthifolius* Raddi, óleo essencial, antimicrobiano.

## ABSTRACTS

GUERRA, Ana Paula. Determination of antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira). 34 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Pato Branco, 2014.

The use of plants for therapeutic purposes is a medicinal tradition among people of various cultures, highlighting the use in treating infections, wounds, venereal diseases, among others. *Schinus* species is characterized by pungent essential oil, concentrated mainly in fruits, which are used in the treatment of respiratory disorders, infections and mycoses. Essential oils are plant raw materials widely used in many industrial sectors, such as perfumes, cosmetics, hygiene, food, pharmaceuticals, among others. One of the techniques widely used in the extraction of essential oil is hydrodistillation that is to distill or boil the plant sample in Clevenger apparatus with water. The aim of this work was the extraction of essential oil *Schinus terebenthifolius* Raddi via hydrodistillation, chemically characterize the essential oil and assess their antimicrobial potential. The plant material (leaves) was collected in the city of Pato Branco, the leaves were dried and stored. The essential oil was extracted by hydrodistillation method in Clevenger apparatus, after the oil obtained was characterized by GC / MS and also used in antimicrobial tests against the strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypimurium*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. As its composition, the major compounds were isocitral,  $\gamma$  - macrocarpeno and  $\beta$  - ocimene. Positive results were obtained for inhibition of four of the five microorganisms tested.

**Keywords:** *Schinus terebenthifolius* Raddi, essential oil, antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	14
Figura 2 – Folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi. ....	20
Figura 3 - a) Sistema Clevenger utilizado na obtenção do óleo essencial das folhas de <i>S. terebenthifolius</i> Raddi.; b) Óleo essencial obtido das folhas de <i>S. terebenthifolius</i> Raddi.....	21
Figura 4 - Cromatograma obtido do óleo essencial das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	25
Figura 5 – Ensaio de inibição da cepa de <i>Escherichia coli</i> .....	28
Figura 6 - Ensaio de inibição da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	29
Figura 7 - Ensaio de inibição da cepa de <i>Bacillus cereus</i> . ....	29
Figura 8 - Ensaio de inibição da cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
Figura 9 - Ensaio de inibição da cepa de <i>Salmonella tiphymurium</i> . ....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	26
--	----

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	12
3.1.1 Características dos óleos essenciais.....	12
3.1.1 Obtenção de óleos essenciais.....	13
3.2 <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (AROEIRA).....	13
3.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA AROEIRA ( <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi) .....	15
3.4 TERPENOS.....	16
3.5 MICRO-ORGANISMOS AVALIADOS .....	16
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.5.3 <i>Salmonella spp.</i> .....	18
3.5.4 <i>Bacillus cereus</i> .....	18
3.5.5 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (AROEIRA).....	20
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	20
4.3 MICRO-ORGANISMOS AVALIADOS .....	21
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi .....	22
4.5 CONDIÇÕES PARA A CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Schinus</i> <i>terebenthifolius</i> Raddi POR CROMATOGRAFIA GASOSA .....	22
4.5.1 Determinação da composição do óleo essencial através do Índice de Kovats (IK) .....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>



5.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	25
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	27
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com finalidade terapêutica é uma tradição medicinal entre povos de várias culturas, destacando o uso no tratamento de infecções, feridas, doenças venéreas, entre outras (DUTRA, 2009). Há provas do uso de plantas medicinais que datam de mais de 60.000 anos. No Peru, foram encontrados utensílios com vestígios de coca com cerca de 50.000 anos (TONIAL, 2010; CORAZZA, 2009).

A partir do início dos anos 80, houve um aumento significativo no interesse por agentes antimicrobianos naturais para o emprego em produtos alimentícios, ou para o uso farmacêutico (DEGÁSPARI *et al*, 2005).

Nos últimos anos têm sido observado um crescente interesse por parte da comunidade científica pelas plantas medicinais e pela fitoterapia, por apresentarem potenciais terapêuticos e econômicos visados, principalmente pela indústria farmacêutica, que realiza estudos para o desenvolvimento de novos produtos (COSTA *et al*, 2010).

De acordo com Boros (2007), a aroeira vem sendo investigada quanto a sua eficácia por sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória, devido ao seu uso terapêutico das frações dos extratos tanto de folhas como caule. Alguns estudos realizados comprovam sua eficácia no combate a microrganismos patogênicos dos extratos e óleo essencial de suas folhas, caule, cascas e frutos.

O presente trabalho visa a obtenção e caracterização química do óleo essencial das folhas *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), como também sua atividade antimicrobiana através de bioensaios contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter o óleo essencial das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), via hidrodestilação com aparelho Clevenger, caracterizar o óleo essencial obtido da extração com uso da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, e determinar seu potencial antimicrobiano frente aos micro-organismos selecionados.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração do óleo essencial das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), via hidrodestilação em aparelho de Clevenger;
- Caracterizar a composição química do óleo essencial obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- Determinar a atividade antimicrobiana do óleo obtido, frente a diferentes micro-organismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*).

## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 3.1.1 Características dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são matérias primas vegetais amplamente utilizadas em diversos setores industriais, como perfumaria, cosméticos, higiene, alimentos, fármacos, entre outros (PORTO, 2010).

Segundo Porto (2010), os óleos essenciais são formados por compostos orgânicos, acumulados ou depositados por plantas em suas estruturas, sendo seus constituintes responsáveis pela sua característica terapêutica. São misturas complexas de substâncias voláteis as quais conferem sabor e aroma aos vegetais. Os óleos essenciais são encontrados nas folhas, ramos, cascas, frutos, flores, raízes, tronco, resinas, e sementes. A variabilidade no teor e composição dos óleos essenciais está relacionada com a localização dos órgãos de armazenamento das plantas (folhas, raízes, etc.) podendo variar também devido às condições climáticas, localização geográfica, características genéticas e ontogenia da espécie. A produção e emissão de compostos voláteis são reguladas também pelo estágio de desenvolvimento do órgão, sendo superior nos estágios iniciais do desenvolvimento (MASETTO, 2009).

Os óleos essenciais são, em geral, uma mistura complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos. Os hidrocarbonetos mais freqüentemente encontrados pertencem ao grupo de substâncias conhecidas como monoterpenos, e em menor freqüência, sesquiterpenos, ambos pertencentes ao metabolismo secundário das plantas (KLEIN e SOUZA, 2012).

### 3.1.1 Obtenção de óleos essenciais

Como diversas substâncias encontradas nos óleos essenciais são termosensíveis, sensíveis a ácidos ou facilmente hidrolizados, a composição e qualidade do produto final dependem do seu procedimento de extração (KLEIN e SOUZA, 2012).

Uma das técnicas amplamente utilizada é a hidrodestilação, na qual o material vegetal é aquecido juntamente com água, fazendo com que os produtos voláteis sejam arrastados juntamente com o vapor de água, por um sistema tipo Clevenger (KLEIN e SOUZA, 2012).

O sistema Clevenger consiste no arraste dos compostos por vapor de água. É o método mais utilizado e viável economicamente para extração de óleos vegetais. Neste processo, a água é aquecida em balão volumétrico sobre uma manta aquecedora, o calor da água faz com que as paredes celulares se abram, desta forma o óleo que está entre as células evapora juntamente com a água, que são conduzidos ao condensador, em seguida o óleo pode ser coletado. Por serem mais leves, os óleos permanecem sobre a camada de água, podendo ser facilmente separado (PISTELLI e SILVA, 2014).

### 3.2 *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)

*Schinus terebenthifolius* Raddi, pertence à família *Anarcadiaceae* e é popularmente conhecida como aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, aroeira-do-campo, aroeira-do-paraná, entre outros (Figura 1) (SILVA, 2009).



**Figura 1 – *Schinus terebinthifolius* Raddi**  
**Fonte: VAREJÃO, 2013.**

A aroeira é uma árvore de grande porte, de casca fina e escamosa. Possui folhas compostas por folíolos lanceolados e pontiagudos, numerosas flores pequenas, brancas ou amarelo-esverdeadas, dispostas em pedículos. O fruto é drupa vermelha e lustrosa, cujo cheiro se assemelha a pimenta (OLIVEIRA JUNIOR *et al*, 2013).

A *S. terebinthifolius* Raddi é originária da América do Sul, nativa do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. No Brasil, pode ser encontrada desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul. Além disso, ela é pioneira e dióica, encontrada em uma extensa distribuição geográfica, incluindo terrenos secos e pobres, apesar de se adaptar melhor em beira de rios e lagos, córregos e várzeas úmidas. Esta característica permitiu sua distribuição em todo território brasileiro (SILVA, 2009; TONIAL, 2010).

Também se destaca por suas propriedades medicinais, e seu extrato das folhas e caule tem sido investigado quanto a sua ação farmacológica. Na medicina popular é amplamente utilizada como adstringente, tônico e estimulante, além de seu uso devido a sua ação antimicrobiana e regeneradora dos tecidos (CORAZZA, 2009).

### 3.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA AROEIRA (*Schinus terebenthifolius* Raddi)

A espécie *Schinus* é caracterizada pelo óleo essencial de cheiro pungente, concentrado principalmente nos frutos, que são utilizados no tratamento de distúrbios respiratórios, micoses e infecções. Estas propriedades são atribuídas a presença de altos teores de monoterpenos nesta espécie. O óleo essencial dos frutos da *S. terebenthifolius* vem sendo investigado quanto a sua atividade antioxidante e anticancerígena (CARVALHO *et al*, 2013).

De acordo com Corazza (2009), as cascas da aroeira, por serem depurativas e febrífugas, possuem ação imediata sobre as hemoptises e afecções uterinas em geral. Já as folhas têm ação anti-reumáticas, além de serem conhecidas como valioso remédio na cura de úlceras e feridas, além de outras aplicações. No caso dos ramos novos, além de servirem para os mesmos fins, são utilizados também na limpeza e branqueamento dos dentes. Aos frutos atribui-se propriedade diurética.

Seus frutos também são utilizados como condimento alimentar, tanto no mercado nacional quanto internacional. O fruto possui de 5,50 a 8,41 % de óleo essencial, sendo os monoterpenos a substância química mais predominante em sua composição, podendo chegar a 85,1 % (OLIVEIRA JUNIOR *et al*, 2013).

Sua resina contém traços de óleos voláteis que apresentam feladrenos, carvacrol e pinenos. Esta última substância, provavelmente confere a propriedade picante, característica dos extratos desta planta (QUEIRES e RODRIGUES, 1998).

Na maioria do emprego medicinal, utiliza-se o extrato aquoso bruto, obtido das cascas, do caule e das folhas. Porém, no meio popular é considerada como uma planta tóxica, pois contém princípios ativos hipersensibilizantes. Alguns relatos indicaram que certas pessoas podem desenvolver irritações da pele, prurido, urticária, febre e transtornos visuais, quando em contato mais íntimo com a planta (QUEIRES e RODRIGUES, 1998).

O uso tradicional desta planta, alguns estudos farmacológicos e ensaios clínicos indicam sua possível utilização como agente antimicrobiano (MARTÍNEZ *et al*, 1996).

### 3.4 TERPENOS

Dentre as classes de produtos naturais de ampla ocorrência em plantas superiores estão os terpenos. Apresentam uma grande diversidade estrutural derivada da junção cabeça-cauda de unidades de cinco átomos de carbonos, denominadas de unidades isoprênicas. A junção de duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades isoprênicas são chamadas de mono, sesqui, di, sester, tri e tetraterpenos, respectivamente. Dessas classes, os monoterpenos ( $C_{10}$ ) e sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) são os principais constituintes dos óleos essenciais (FEHLBERG, 2011).

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos. Os monoterpenos podem, ainda, ser divididos em três subgrupos: acíclicos (exemplo mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (exemplo  $\alpha$ -terpineol e terpinoleno) e bíciclicos (exemplo  $\alpha$ -pineno, tujona, cânfora, fenchona). Em cada um desses subgrupos ainda há outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (exemplo limoneno), álcoois (exemplo mentol), aldeídos ou cetonas (exemplo mentona e carvona), lactonas (os monoterpenos lactônicos são chamados de iridóides, exemplo nepetalactona) e tropolonas (exemplo  $\gamma$ -tujaplicina). As variações dos sesquiterpenos são da mesma natureza que as precedentes, podendo ser acíclicos, monocíclicos ou bíciclicos ou lactonas sesquiterpênicas. Em cada um desses subgrupos, classificam-se inúmeras substâncias, caracterizadas por cerca de 200 tipos diferentes de esqueletos. O número de compostos terpênicos conhecidos ultrapassa a 8000; como componentes descritos em óleos voláteis, é estimado um número superior a 150 monoterpenos e 1000 sesquiterpenos (SIMÕES *et al*, 2010).

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS AVALIADOS

#### 3.5.1 *Escherichia coli*



*Escherichia coli* é a espécie dominante entre os diversos micro-organismos anaeróbios facultativos que fazem parte da flora intestinal de animais de sangue quente. Esse micro-organismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e são bacilos Gram-negativos (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

O significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser observado em dois aspectos. Inicialmente *E. coli*, por ser uma enterobactéria, uma vez detectada no alimento, indica que esse alimento tem uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas inadequadas. O segundo é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

### 3.5.2 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados, imóveis, com maior crescimento, sob condições aeróbias na qual produzem catalase. Pertencentes à família *Micrococcaceae*, aparecem como forma de cacho de uva, ocorrem isolados, aos pares e em aglomerados (FRANCO e LANDGRAF, 2008; HAJDENWURCEL, 1998).

*Staphylococcus aureus* são bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 °C a 47,8 °C, produtores de enterotoxinas entre 10 °C e 46 °C, com ótimo entre 40 °C e 45 °C. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram neste intervalo de temperatura por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. São encontrados em lesões de pele e nas vias aéreas do homem. Essa espécie é a que está associada mais frequentemente às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não (FRANCO e LANDGRAF, 2008; HAJDENWURCEL, 1998).

Segundo Franco e Landgraf (2008), a presença de números elevados de *S. aureus* indica perigo à saúde humana, devido ao fato de *S. aureus* produzir uma toxina chamada enterotoxina estafilocócica, bem como à sanificação (é realizada quando se reduz os microrganismos a um número considerado isento de perigo) questionável, principalmente quando o processamento envolve manipulação do alimento.

### 3.5.3 *Salmonella spp.*

São bastonetes, Gram negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes a família Enterobacteriaceae. São móveis, não produtores de esporos, a temperatura de crescimento se encontra entre 35 °C a 37 °C.

A patologia pode ser manifestada de duas maneiras: a febre tifóide e paratifóide; e também gastroenterite ou salmonelose. No caso da febre tifóide e paratifóide, estas afetam primatas de modo praticamente exclusivo, sendo as salmonellas disseminadas pela água e alimentos, nesses casos, a dose de infecção é baixa, e período de incubação longo, desenvolvendo-se um quadro clínico caracterizado por septicemia, sendo ainda freqüente a presença de portadores assintomáticos por longos períodos. Já nos casos de gastroenterites ou salmoneloses, o período de incubação varia de 12 a 24 horas, e os principais sintomas são febre, diarréia mucosa, e em alguns casos acompanhadas de sangue, dores abdominais, náuseas e vômitos (HAJDENWURCEL, 1998).

As principais medidas preventivas para se evitar a contaminação de alimentos por *Salmonella* são: medidas higiênicas no processamento e manuseio de alimentos, procedimentos de higiene adequado de utensílios e equipamentos, tratamento térmico adequado (HAJDENWURCEL, 1998).

### 3.5.4 *Bacillus cereus*

Pertence a família *Bacillaceae*. São bastonetes, Gram positivos, anaeróbios facultativos, mesófilos, produtor de esporos. Podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (entre 8 a 55 °C), porém sua faixa ótima de crescimento entre 28 – 35 °C. O *B. cereus* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, é hospedeira natural do solo, de vegetais e restos fecais do homem e de animais (HAJDENWURCEL, 1998).

A importância deste micro-organismo quanto à saúde humana se dá devido a duas toxinas: diarréica e emética. A síndrome diarréica caracteriza-se pelos sintomas como diarréia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, e raramente náuseas e vômito. Já a síndrome emética caracteriza-se por náuseas e vômitos,

podendo ser acompanhada de dores abdominais e diarreia (HAJDENWURCEL, 1998).

### 3.5.5 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, é móvel devido a flagelos, apresentando movimento característico denominado tombamento, que auxilia na sua identificação. Apresenta crescimento na faixa de 2,5 °C a 44 °C, embora existam relatos de crescimento a 0 °C. É encontrado em uma ampla variedade de habitats, como animais silvestres, seres humanos, solo, esgotos, vegetais em decomposição, entre outros (SILVA, 2009).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)

As folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira) (Figura 2) foram obtidas no mês de janeiro de 2014, no município de Pato Branco - PR, e secas à temperatura ambiente por aproximadamente 72 horas. Após este procedimento as folhas foram trituradas, embaladas e armazenadas.



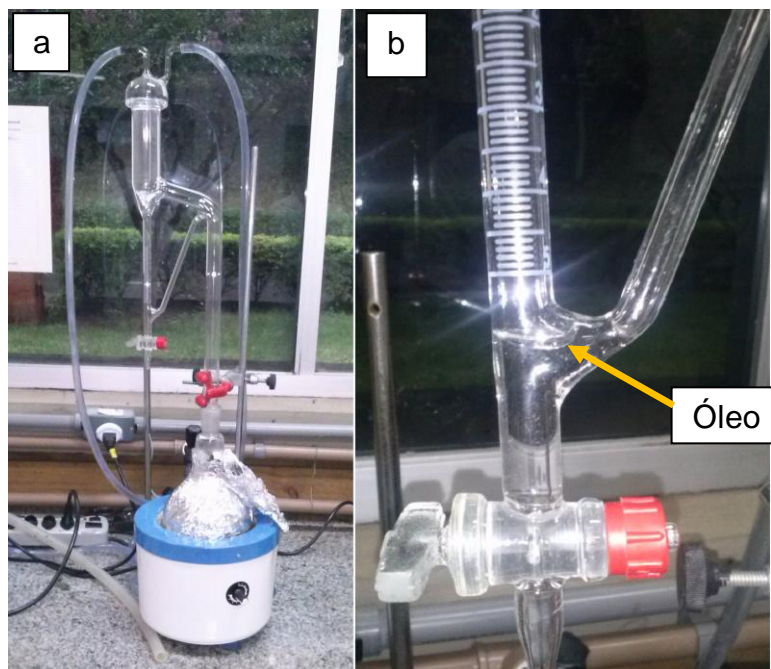
**Figura 2 – Folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi.  
Fonte: Próprio autor.**

### 4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

O óleo essencial das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira) foi obtido através de hidrodestilação, utilizando um aparelho Clevenger (Figura 2.a). A

extração do óleo foi realizada num período de 3 horas. É possível observar a separação do óleo em um momento da extração na Figura 2.b.

A amostra de óleo essencial foi armazenada em frasco âmbar e refrigerada até o momento das análises.



**Figura 3 - a) Sistema Clevenger utilizado na obtenção do óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi, composto por Clevenger, manta de aquecimento, refrigeração a água e balão de 2 L envolto por papel alumínio; b) Óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi obtido por hidrodestilação. Fonte: Próprio autor.**

#### 4.3 MICRO-ORGANISMOS AVALIADOS

Os micro-organismos selecionados para a realização da determinação da atividade antimicrobiana através de bioensaios são:

- *Escherichia coli*, ATCC 25922;
- *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923;
- *Salmonella typhimurium*, ATCC 14028;
- *Bacillus cereus*, ATCC 14579;
- *Listeria monocytogenes*, ATCC 19115.

Os micro-organismos utilizados nos bioensaios foram cedidos pelo Laboratório São Rafael – Análises de Alimentos e Água, situado em Pato Branco – PR.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

A determinação da atividade antimicrobiana seguiu a metodologia empregada por Barbosa (2008).

Os ensaios foram realizados pela técnica de difusão em meio sólido, método de cavidade em placa. Os micro-organismos foram previamente inoculados em caldo BHI por 24 horas, a  $36 \pm 1$  °C. Após, foi preparado o meio Agar Nutriente devidamente estéril e verteu-se aproximadamente 20 mL de meio em cada placa de Petri estéril, aguardou-se sua solidificação.

Após a solidificação do meio de cultura, inoculou-se cada micro-organismo, utilizando-se o método de secagem de superfície. Seguindo o procedimento, foram feitas cavidades de 4,0 mm de diâmetro no agar. Inoculou-se em cada cavidade, 20 µL do óleo essencial das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi na concentração de 100 %. As placas foram incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 48 horas.

Os ensaios foram realizados em triplicata, e como controle positivo utilizou-se o antibiótico gentamicina 40 mg/L.

#### 4.5 CONDIÇÕES PARA A CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebenthifolius* Raddi POR CROMATOGRAFIA GASOSA

A amostra do óleo essencial foi armazenada em *vial* e sob refrigeração até ser submetida à análise. A caracterização do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada Espectrometria de Massas, nas seguintes condições: coluna VA-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), temp. inj. 250°C, rampa de aquecimento 60°C - 3° C/min - 240°C, gás hélio, fluxo de 1mL/min.

#### 4.5.1 Determinação da composição do óleo essencial através do Índice de Kovats (IK)

Para determinar a composição do óleo das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi, uma amostra do mesmo foi submetida a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, de posse dos espectros de massa foram calculados os Índices de Kovats (Equação 1) e posteriormente comparados com a literatura (ADAMS, 2007).

$$I = 100 \times \left[ n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{unknown})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right] \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

I= Índice de Kovats;

n = número de carbonos do menor *n*-alcano;

N = número de carbonos do maior *n*-alcano;

$t'_{r(N)}$  = tempo de retenção do padrão do maior número de átomos de carbono;

$t'_{r(n)}$  = tempo de retenção do padrão do menor número de átomos de carbono;

$t_r$  = tempo de retenção do componente.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

A determinação da densidade do óleo essencial das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi foi realizada através de método direto (medições diretas da massa e do volume do óleo essencial) adaptado de Pala *et al*, 2010.

O volume do óleo essencial foi medido com auxílio de micropipeta, capacidade de medição de 200  $\mu\text{L}$ , e sua massa foi medida em balança analítica.

O método direto para determinação da densidade consiste em calcular a razão entre massa e volume (Equação 2).

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$\rho$  = densidade;

$m$  = massa;

$V$  = volume.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

A análise da composição química do óleo essencial obtido das folhas da *S. terebenthifolius* Raddi foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas (CG/EM). O cromatograma obtido está mostrado na Figura 4.

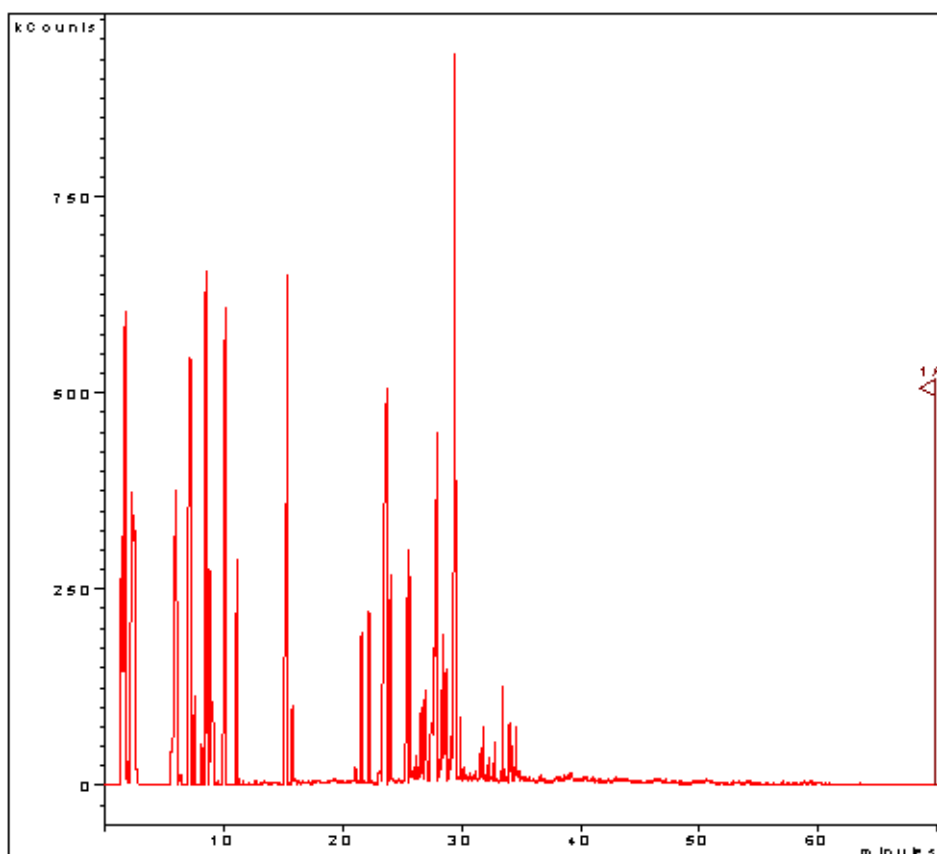


Figura 4 - Cromatograma obtido do óleo essencial das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi.  
Fonte: Próprio autor.

### 5.1.1 Composição química do óleo essencial das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Determinou-se a composição química do óleo essencial das folhas da *Schinus terebenthifolius* Raddi através do cálculo do índice de Kovats. Estes índices foram comparados com os dados encontrados na literatura (ADAMS, 2007). A composição química do óleo essencial das folhas da *Schinus terebenthifolius* Raddi está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.**

Nome do composto	Fórmula molecular	Abundância %	IKC <sup>1</sup>	IKL <sup>2</sup>
Santolina trieno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,0	896	908
δ-2-careno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	2,6	1003	1002
β-ocimeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	4,7	1040	1050
ρ-menta-3,8-dieno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,7	1067	1072
Isocitral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	5,9	1187	1180
α-copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	3,5	1383	1376
β-cubebeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1,6	1393	1388
β-gurjuneno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,6	1428	1433
β-copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1,1	1434	1432
γ-macrocarpeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	7,6	1527	1528

<sup>1</sup> Índice de Kovatz calculado.

<sup>2</sup> Índice de Kovatz literatura.

Fonte: Próprio autor.

O Índice de Kovats de um alcano é determinado pelo número de carbonos que contém multiplicado por 100. Logo, o heptano apresenta Índice de Kovats 700, o octano 800, e assim sucessivamente (LENZ *et al*, 2011).

Conforme descrito na Tabela 1, identificou-se cerca de 10 compostos químicos no óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi. Como pode ser observado, a sua totalidade está dividida em monoterpenos (C<sub>10</sub>) e sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), o que condiz com a literatura (FEHLBERG, 2011 e SIMÕES *et al*, 2010),

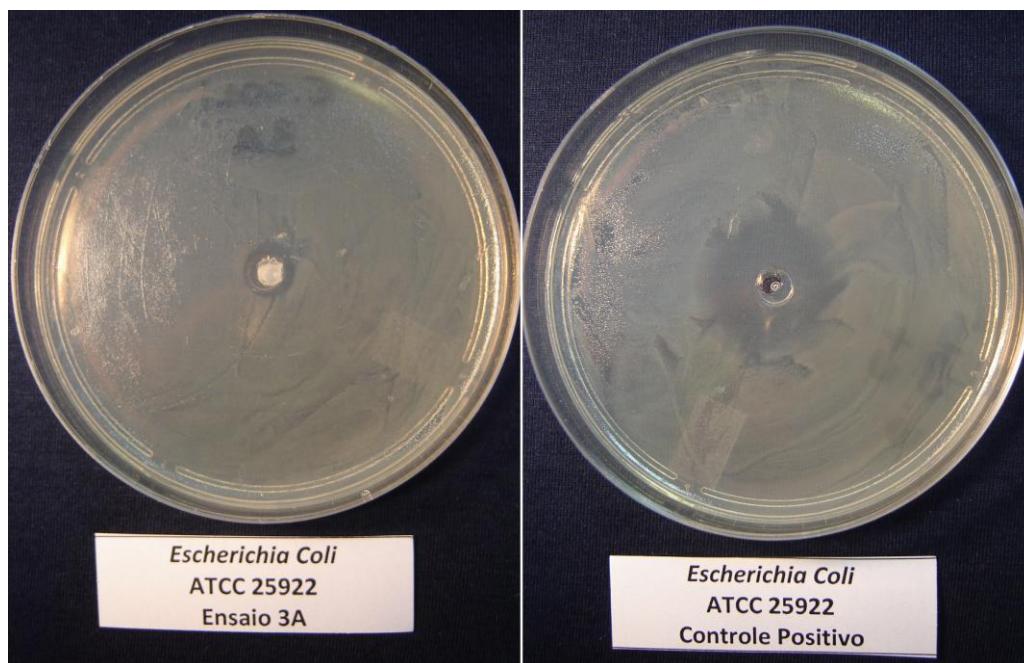
sendo os compostos majoritários  $\gamma$ -macrocarpeno (7,6 % da sua composição química), isocitral (5,9 %) e  $\beta$ -ocimeno (4,7 %).

A densidade do óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi foi avaliada por método de medição direta adaptado de Pala *et al*, 2010, obtendo-se o valor de 0,87 g/cm<sup>3</sup> para o óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi. Cada extração realizada com massa média de 75 g rendeu aproximadamente 0,4 mL de óleo, sendo rendimento calculado próximo a 0,65 %, valor esperado para as folhas, rendimento maior (2,0 %) pode ser encontrado na casca da *S. terebenthifolius* Raddi segundo NICOLINI *et al*, 2009.

## 5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

A atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi foi realizada através da técnica de difusão em ágar, método de cavidade em placa. As Figuras 5, 6, 7, 8 e 9 mostram os halos de inibição formados contra as linhagens bacterianas testadas.

O resultado obtido do bioensaio contra a linhagem de *Escherichia coli* está representado na Figura 5.

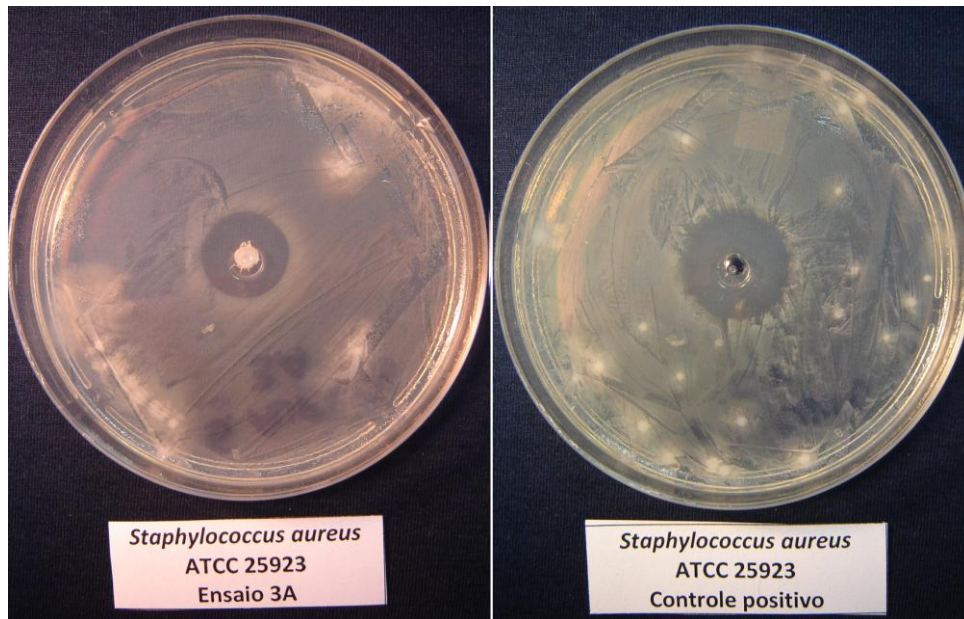


**Figura 5 – Ensaio de inibição da cepa de *Escherichia coli* (esquerda) e controle positivo (antibiótico gentamicina 40 mg/L) (direita).**

**Fonte: Próprio autor.**

Os resultados foram positivos para inibição com halo de inibição médio de 0,9 cm de diâmetro. Estes valores demonstram o potencial inibitório do óleo frente a micro-organismos patógenos como a *Escherichia Coli*. Em comparação com o halo formado pelo padrão 2,5 cm de diâmetro, os ensaios biológicos para esta cepa foram satisfatórios.

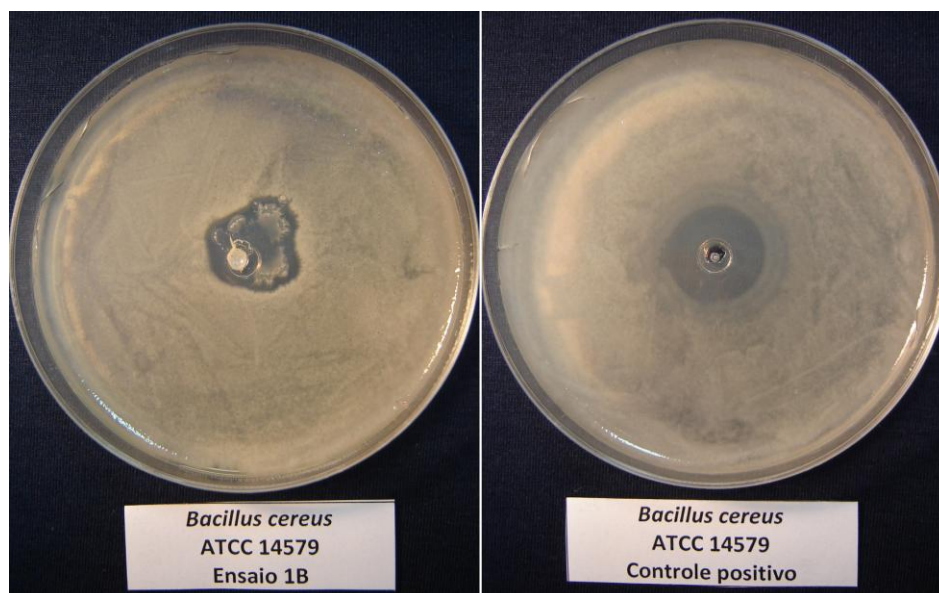
A Figura 6 apresenta o halo de inibição da cepa *Staphylococcus aureus* frente ao óleo essencial de *Schinus terebenthifolius* Raddi. É possível notar um halo muito superior ao encontrado com as cepas de *Escherichia Coli*, a média de diâmetro para os ensaios com a cepa de *Staphylococcus aureus* foi de 1,6 cm, também apresentando potencial inibitório.



**Figura 6 - Ensaio de inibição da cepa de *Staphylococcus aureus* (esquerda) e controle positivo (antibiótico gentamicina 40 mg/L) (direita).**

**Fonte: Próprio autor.**

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos com a aplicação do óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi nas cepas de *Bacillus cereus* e também o controle positivo realizado.

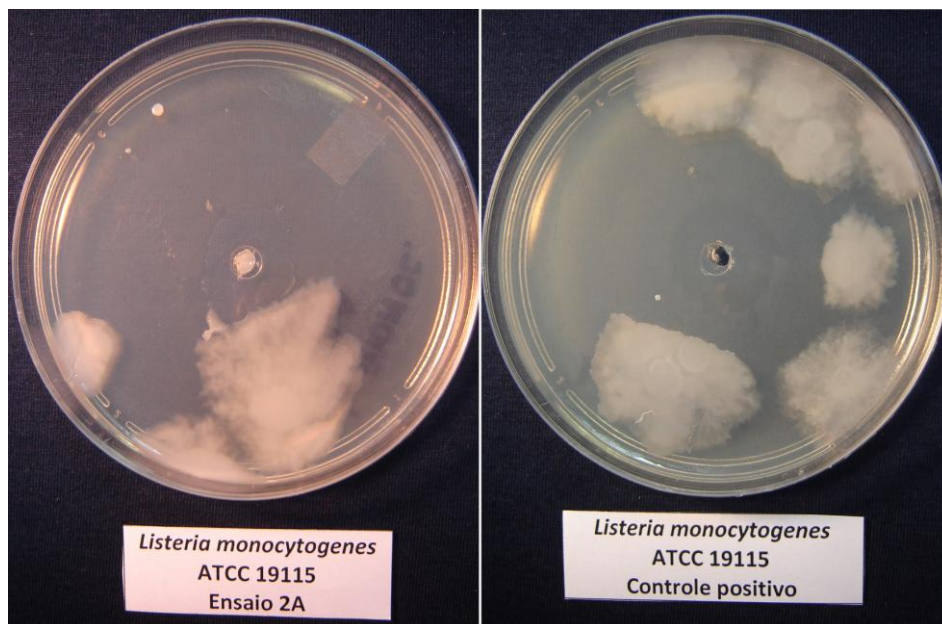


**Figura 7 - Ensaio de inibição da cepa de *Bacillus cereus* (esquerda) e controle positivo (antibiótico gentamicina 40 mg/L) (direita).**

**Fonte: Próprio autor.**

Os resultados obtidos com a aplicação do óleo essencial apresentaram resultados positivos para inibição em cepas de *Bacillus cereus* com halo de inibição médio de 2,0 cm de diâmetro, sendo este valor igual ao encontrado o ensaio realizado com gentamicina 40 mg/L (controle positivo).

A Figura 8 apresenta os halos de inibição para o ensaio e controle positivo em cepas de *Listeria monocytogenes*.



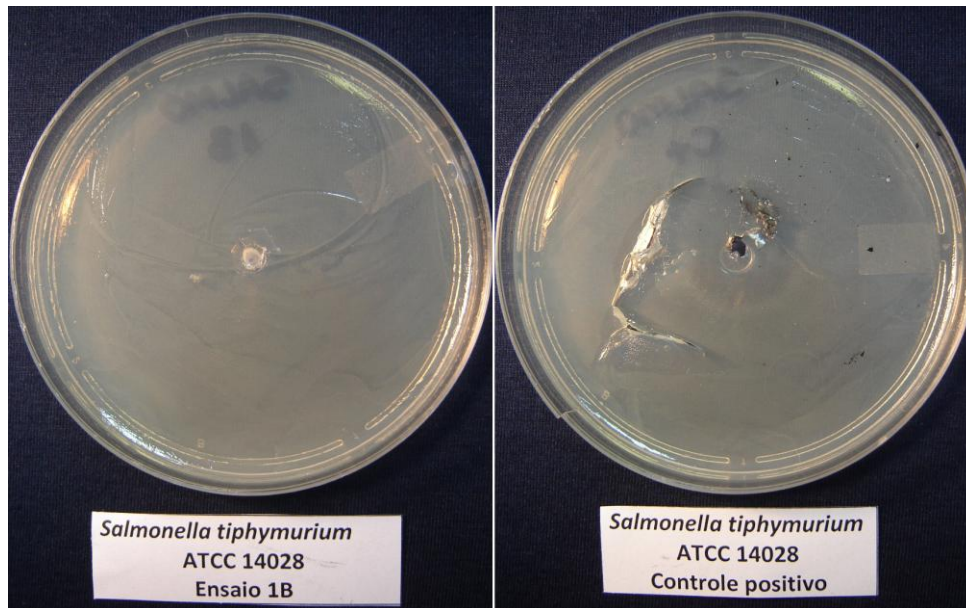
**Figura 8 - Ensaio de inibição da cepa de *Listeria monocytogenes* (esquerda) e controle positivo (antibiótico gentamicina 40 mg/L) (direita).**

**Fonte: Próprio autor.**

As cepas de *Listeria monocytogenes* apresentaram halo de inibição pouco inferior a *Escherichia Coli*, com valor médio de 0,8 cm de diâmetro.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos com a aplicação do óleo essencial em cepas de *Salmonella tiphymurium* e o controle positivo.





**Figura 9 - Ensaio de inibição da cepa de *Salmonella typhimurium* (esquerda) e controle positivo (antibiótico gentamicina 40 mg/L) (direita).**

**Fonte: Próprio autor.**

O resultado obtido com a aplicação do óleo essencial de *S. terebenthifolius* Raddi contra as cepas de *Salmonella typhimurium* foram negativos, não apresentaram halo de inibição.

## 6 CONCLUSÃO

Através da composição química do óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi obtida com a análise em CG/EM observou-se uma grande diversidade de compostos orgânicos presentes no óleo essencial, apresentando em sua maioria monoterpenos e sesquiterpenos hidrogenados, e sendo os compostos majoritários: isocitral,  $\gamma$ -macrocarpeno e  $\beta$ -ocimeno.

Considerando a escassez de literatura específica sobre a avaliação da composição química do óleo essencial das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi, este trabalho apresenta uma contribuição significativa.

Com a avaliação antimicrobiana, comprovou-se seu potencial no controle de micro-organismos patogênicos, apresentando resultados positivos para quatro dos cinco micro-organismos testados, sendo alguns deles resistentes a antibióticos, como por exemplo, o *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, é possível afirmar que há a necessidade de pesquisas com o óleo essencial de *Schinus terebenthifolius* Raddi, tanto das folhas como de outras partes da planta.

Este trabalho apontou a necessidade de continuidade nas pesquisas (por trabalhos subsequentes) para se obter melhores condições de uso e aplicação do óleo essencial de *S. terebenthifolius* Raddi, na sua utilização como sanificante ou como possível remédio fitoterápico.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert A. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4ª Edição. Allured Publishing Corporation, 2007.

BARBOSA, Daniela Beraldo. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anarcadium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

BOROS, Luiz Felipe. **Ação antimicrobiana do extrato de hidroalcoólico de folhas da *Shinus Terebenthifolius Raddi* (Aroeira)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Pós-Graduação do Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. ***Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 15, n. 1, p. 158-169. 2013.

COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; ARRUDA, T. A.; OLIVEIRA, P. T.; DAMETTO, F. R.; CARVALHO, R. A.; MELO, M. D. **Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis***. Jornal Brasileiro de Patologia Médica, v. 46, n. 3, p. 175-180. Junho de 2010.

CORAZZA, Patrícia Érika Rabelo e Silva. **Estudos físico-químicos, biológicos, validação de metodologia analítica e desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida a partir de extrato de aroeira da praia (*Shinus Terebenthifolius Raddi*)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. **Atividade antimicrobiana de *Shinus Terebenthifolius Raddi***. Revista Ciência Agrotécnica, v. 29, n. 3, p. 617-622. Maio/Junho de 2005.

DUTRA, M.G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. 2009. Anápolis. 112p. Mestrado em sociedade, tecnologia e meio ambiente. Centro Universitário de Anápolis.

FEHLBERG, ISLEY. **Terpenos e fenilpropanoides de Myrcia guianensis (Myrtaceae)**. 2011. Tese (Doutorado em Química, área de concentração em Química Orgânica), Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

FRANCO, Bernadette D.G.M; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo, Atheneu, 2008.

HAJDENWURCEL, Judith Regina. **Atlas de Microbiologia de Alimentos**. Editora Fonte. Vol. 1. São Paulo, 1998.

KLEIN, A. P. P.; SOUZA, J. **Otimização do processo de obtenção do óleo essencial de folhas frescas e secas de Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) por hidrodestilação**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso, Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

LENZ, G. F.; ROCHA, E. M. S. da; FREITAG, J. A.; CONTESINI, M. A.; SIMSEN, V. L.; KLAGENBOECH, R.; MARTIN, C. A.. **Determinação do índice de Kovats para misturas de álcoois utilizando software simulador de cromatografia gasosa**. Anais do III ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Toledo. 2011.

MARTÍNEZ, M. J.; GONZÁLEZ, N. A.; BADELL, J. B. **Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal)**. Revista Cubana de Plantas Mediciniais, 1996.

MASETTO, MAGDA APARECIDA MAIA. **Ácido giberélico e extrato de alga marinha na produtividade e composição do óleo essencial de lavanda (*Lavandula dentata* L.)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná.

NICOLINI, J. V.; PUGET, F. P.; MAZZA, M. G. G.. **Avaliação da eficiência de extração de óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* RADDI (aroeira vermelha) pelos métodos de hidrodestilação e arraste a vapor**. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. 2009.

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G.; SANTOS, R. B.; REIS, F. O.; MATSUMOTO, S. T.; BISPO, W. M. S.; MACHADO, L. P.; OLIVEIRA, L. F. M. **Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre *Colletotrichum gloeosporioides***. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 15, p. 150-157, 2013.

PALA, A. C. T.; SALIN, C. T.; CORTEZ, L. E. R.. **Controle de qualidade de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinum officinalis*) e lavanda (*Lavandula augustifolia*) comercializados em farmácias de dispensação**. V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica. CESUMAR – Centro Universitário de Maringá. Maringá – Paraná. 2010.

PISTELLI, E. C; SILVA, A. B. **Descrição da metodologia do uso de Clevenger na extração de óleos essenciais**. Disponível em: <http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/xisemic/resumos/482.html> .Acesso em: 17 janeiro 2014.

PORTO, ROMULO DE SOUSA. **Ação do óleo essencial de *Croton argyrophyloides* muell. Arg. e de um de seus constituintes o  $\beta$ -cariofileno em músculo liso fásico de rato**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.

QUEIRES, L. C. S. e RODRIGUES, L. E. A. **Quantificação de substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi)**. 1998.

SILVA, Fernano Merlin. **Listeria monocytogenes: um perigo invisível nos alimentos**. Trabalho de Conclusão de Curso, Medicina Veterinária, Faculdades Metropolitanas Unidas. São Paulo, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Sexta edição. Editora da UFSC. Florianópolis, 2010.

TONIAL, Fabiana. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Shinus Terebenthifolius Raddi* (Aroeira)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VAREJÃO, Paula. **Incaper incentiva a produção de pimenta-rosa no Estado**. Disponível em: <<http://www.es.gov.br/Noticias/120190/detalhes.htm>>. Acesso em: 30 agosto 2013.