

EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FUNCHO E ERVA-DOCE PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

LUÍSA T. M. SILVA^{1*}
DIRLEI D. KIERLING²

O funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) e a erva-doce (*Pimpinella anisum*) são plantas aromáticas que vêm sendo estudadas por sua atividade antimicrobiana, muito requisitada já que provém de fontes naturais. Esta atividade está relacionada com a presença de fenólicos e flavonoides totais. O presente trabalho teve como objetivo extrair o óleo essencial de cada semente, estudar sua atividade antimicrobiana e quantificar a presença de fenólicos e flavonoides totais. A extração foi realizada por hidrodestilação no equipamento Clevenger por 2 h e, para a erva-doce, realizou-se purificação com sulfato de sódio em excesso após a obtenção do óleo. O rendimento encontrado para o funcho foi de 3,10% e de 1,25% para a erva-doce (m/m). A atividade antimicrobiana foi analisada pelo método de difusão em disco e pela concentração inibitória mínima com as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para o funcho, obteve-se halo de 8 mm para *E. coli* e 7 mm para *S. aureus*. Para a erva-doce, encontrou-se 7 mm para ambas as bactérias. Para a concentração inibitória mínima, obteve-se 90 mg/mL tanto para funcho quanto para erva-doce também para ambas as bactérias. Os fenólicos totais foram quantificados por método colorimétrico, com reagente Folin-Ciocalteu, encontrando-se $24,1 \pm 1,0$ mg EAG/ g de óleo de funcho e de $10,9 \pm 1,0$ mg EAG/ g de óleo de erva-doce. Para os flavonoides, também se utilizou método colorimétrico, com cloreto de alumínio, e encontrou-se $52,4 \pm 1,6$ mg EAQ/ g de óleo de funcho e $9,15 \pm 0,37$ mg EAQ/ g de óleo de erva-doce.

PALAVRAS-CHAVE: Flavonoides; fenólicos; plantas aromáticas.

¹Discente, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná

²Docente, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná

*E-mail para correspondência: luisa.moreira42@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem diversas maneiras de defesa. A liberação de compostos voláteis é uma delas. Este mecanismo protege a planta de microrganismos e herbívoros. Os compostos voláteis compõem os óleos essenciais, os quais são lipossolúveis e possuem propriedades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas (CHOUCHAN et al., 2017).

Estes óleos estão muito presentes em plantas medicinais, utilizadas há milhares de anos, e vêm ganhando maior popularidade na pesquisa em alimentos, já que são métodos naturais de conservação. Além disso, também estão sendo muito estudadas na área médica e farmacêutica, pois suas propriedades antibacterianas podem ser uma alternativa no tratamento de doenças causadas por bactérias e fungos que já adquiriram resistência aos antibióticos convencionais (NAZZARO et al., 2017; CHOUCHAN et al., 2017).

Os óleos essenciais são compostos majoritariamente por terpenos e compostos fenólicos. Estes possuem anéis aromáticos em sua estrutura e são amplamente utilizados como antioxidantes, porém também possuem capacidade antimicrobiana, antiviral, entre outras (MARTINS, 2012). Eles são um grupo formado pelos flavonoides, taninos, tocoferóis e ácidos fenólicos (ANGELO, JORGE, 2007). Os flavonoides têm sua ação antimicrobiana através da formação de isoflavonoides, flavonas e flavononas, as quais inibem o crescimento de esporos e micelas (MARTINS, 2012).

Uma das plantas mais amplamente utilizadas devido às suas propriedades medicinais é o funcho (*Foeniculum vulgare* Mill., família *Apiaceae*), sendo usado como anti-inflamatório, analgésico, diurético, entre outros (ANWAR et al., 2019). Assim como o funcho, a erva-doce (*Pimpinella anisum*) é uma planta utilizada há muito tempo. Pertencente à família *Apiaceae*, seu óleo é versátil, sendo utilizado nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos (AMER, ALY, 2019). Ambas a plantas são compostas majoritariamente por trans-anetol, um composto volátil do grupo dos fenilpropanoides (REBEY et al., 2019; AHMAD et al., 2018; ALVES, 1998).

Este trabalho teve como objetivo realizar análises químicas e microbiológicas nos óleos das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill. e *Pimpinella anisum*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram divididos em três partes: extração, análise química e análise microbiológica.

A extração dos óleos de erva-doce e funcho foi realizada utilizando o equipamento Clevenger. Foram utilizadas 30 g de amostra para 400 mL de água destilada, deixadas em destilação por 2 horas. Após o tempo de destilação, o óleo foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e armazenado em freezer.

Para o óleo de erva-doce, foi realizada purificação utilizando sulfato de sódio em excesso.

Para a análise de atividade antimicrobiana, foram feitos testes em discos (Kirby-Bauer), seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) criopreservadas em glicerina. As bactérias foram ativadas em caldo BHI por aproximadamente 24 h a 36°C. A concentração da suspensão foi aferida para atingir turbidez de 0,5 na escala McFarland (10^8 UFC/mL) utilizando solução salina 0,9%. Esta suspensão foi então inoculada em placas com ágar Müller-Hinton, espalhando gentilmente por toda a placa com swab estéril. Os discos foram embebidos com 10 µL de cada óleo e posicionados nas placas. O controle positivo consistiu em discos de cloranfenicol (30 µg) e o controle negativo foi feito com água destilada esterilizada. Após a inoculação e posicionamento dos discos, as placas foram levadas para estufa a 35°C por 24 h e o halo de inibição foi medido com régua escolar.

Também foi realizado o teste de concentração mínima de inibição (CMI) para as mesmas suspensões de bactérias, baseando-se na metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). Foi feito um controle positivo e negativo para cada bactéria, nos quais utilizou-se 100 µL de caldo TSB (Trypticase Soy Broth) em cada poço para controle negativo e o meio com 10 µL da suspensão bacteriana para controle positivo. Para testar a CMI do óleo, foi adicionado 10 µL no primeiro poço, e para os próximos, adicionou-se 10 µL do antecedente, obtendo-se diluições de 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ e 1:10⁸. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 24 horas para posterior leitura dos resultados.

Para análise dos fenólicos totais, o óleo foi diluído em solução 1:400 com etanol 80%. Pipetou-se em tubo de ensaio 2,5 mL de solução 1:10 de Folin-Ciocalteu, 500 µL da diluição de óleo e 2 mL da solução de Na₂CO₃. Os tubos foram incubados a 45 °C por 15 min e, a seguir, deixados em ambiente escuro por 30 min. As leituras da absorvância foram realizadas a 765 nm (Costa et al., 2012). A concentração foi determinada por meio da curva padrão de ácido gálico (5 a 40 µg/mL): $y = 0,00899x + 0,0656$; R² = 0,986.

Para análise dos flavonoides, o óleo foi diluído em solução 1:100 com etanol 80%. Pipetou-se em tubo de ensaio 4 mL de etanol absoluto, 300 µL da solução de nitrito de sódio e 1 mL da diluição de óleo. Após 5 min, pipetou-se 300 µL da solução de cloreto de alumínio e 1 min depois foi adicionada solução de NaOH 1 mol/L e mais 2,4 mL de álcool absoluto. A absorvância foi lida a 510 nm (Costa et al., 2012). A concentração foi determinada a partir da curva padrão de queracetina (200 a 1000 µg/mL): $y=0,00015x-0,0183$; R² de 0,958.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a erva-doce, encontrou-se um rendimento aproximado de 1,25% m/m, enquanto para o funcho obteve-se um rendimento de 3,10% m/m ou 3,17% v/m.

O rendimento do funcho assemelha-se ao de Anwar et al. (2009), que obteve 2,81% m/m por hidrodestilação. Já Diao et al. (2014) encontrou um rendimento menor, de 1,74% v/m. Este resultado também se assemelhou ao

estudo de Mota (2014), que encontrou rendimentos entre 2,5 a 0,5% v/m para funchos colhidos em diversos pontos do Brasil. Já para a erva-doce, o rendimento encontrado foi mais preciso, já que os óleos foram purificados com sulfato de sódio em excesso. O rendimento foi próximo do estudo de Arslan et al. (2004), que encontrou 1,3 a 3,7% m/m para diferentes tipos de erva-doce.

Em estudo realizado por Rebey et al. (2019), o rendimento encontrado para óleo de erva-doce colhida já madura foi maior quando comparado à colheita imatura, o que indica uma maior produção de óleo durante a fase final de maturação. Tanto para a erva-doce quanto para o funcho, desconhece-se o estágio de maturação das ervas, portanto este é um fator que pode ter afetado tanto o rendimento quanto os componentes importantes para a atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana para cada óleo e cada controle se encontram no Quadro 1.

QUADRO 1 – DIÂMETRO (MM) DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA CADA CEPA E CADA ÓLEO

Cepa	Funcho	Erva-doce	Controle +*
<i>E. coli</i>	8	7	26
<i>S. aureus</i>	7	7	25

*O controle positivo: discos de cloranfenicol (30 µg). Testes realizados em duplicata.

Pode-se perceber que houve similaridade nas atividades antimicrobianas de ambos os óleos, porém com um halo maior para *E. coli* no óleo de funcho. Embora tenha sido verificada atividade, o tamanho dos halos se distanciou bastante de estudos como de Ouis e Hariri (2021), que encontraram halos de inibição de 11,4 mm para *E. coli* e 12,6 mm para *S. aureus* com óleo de erva-doce, enquanto para o funcho, Gulfraz et al. (2008) encontrou um halo de 16 mm para *E. coli*.

Para o teste de concentração inibitória mínima, percebeu-se que para os óleos tanto de funcho quanto de erva-doce apenas a primeira concentração (1:10) apresentou inibição para *S. aureus*, tal qual para *E. coli*, portanto a CMI foi de 90 mg/mL.

Este resultado se distancia do estudo de Ouis e Hariri (2021), que encontraram 6,25 mg/mL para a *S. aureus*, porém se aproxima relativamente do resultado para *E. coli*, no qual obtiveram 50 mg/mL com o óleo de erva-doce. Já para o funcho, Diao et al. (2014) encontraram uma concentração inibitória de 0,25 mg/mL para *E. coli* e >10 mg/mL para *S. aureus*. As diferenças nos valores obtidos se devem a diversos fatores, como características e composição da matéria-prima e armazenagem dos óleos essenciais.

O resultado da CMI corrobora com o teste de difusão, já que ambos apresentaram uma baixa atividade antimicrobiana.

Há uma grande discordância entre autores quanto ao tipo de bactéria mais sensível ao óleo essencial. Para Gulfraz et al. (2008), não houve diferença entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Porém, Ouis e Hariri (2021) discorrem sobre as diferenças entre os estudos de diversos autores e suas hipóteses.

Chao et al. (2000) explica a relação de solubilidade entre o material externo da parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas com os óleos essenciais (material hidrofóbico). Segundo Ouis e Hariri (2021), não foi determinado com exatidão o mecanismo de ação dos óleos essenciais, porém sabe-se que é uma ação conjunta dos componentes presentes nos óleos, e que uma maior presença de hidrocarbonetos monoterpenicos, como o terpeno, e de compostos fenólicos, como o eugenol, gera uma maior inibição microbiana. Ainda, alguns componentes presentes em menores quantidades podem ter efeitos sinérgicos, auxiliando outros componentes na inibição.

Alguns dos efeitos causados nas bactérias pelos óleos essenciais foram reunidos em um estudo por Burt (2004), que indica o vazamento do conteúdo celular, coagulação do citoplasma, degradação da parede celular, entre outros. Estes efeitos são causados pelos diversos componentes dos óleos, principalmente os compostos fenólicos. Além disso, os óleos essenciais agem nas enzimas que atuam na produção de energia e nas sínteses dos componentes celulares. O grupo hidroxila dos compostos fenólicos é de grande importância na ação dos óleos, já que perturba o movimento de elétrons e prótons da célula. No eugenol, este grupo se liga a proteínas, prevenindo a ação de enzimas na célula (BURT, 2004).

Ademais, é importante notar que o halo encontrado neste trabalho é bem menor que o encontrado em outros estudos, o que pode ter sido causado pela impureza do óleo ou também pela matéria-prima não tão rica em compostos aromáticos. Além disso, é importante pontuar que a proveniência da matéria-prima é desconhecida, assim como suas características de plantio, colheita, beneficiamento e armazenamento.

Para fenólicos totais, encontrou-se uma média de concentração de $24,1 \pm 1,0$ mg EAG/ g de óleo de funcho e $10,9 \pm 1,0$ mg EAG/ g de óleo de erva-doce. Enquanto para os flavonoides totais, encontrou-se uma média de concentração de $52,4 \pm 1,6$ mg EAQ/ g de óleo de funcho e $9,15 \pm 0,37$ mg EAQ/ g de óleo de erva-doce.

O resultado de fenólicos totais assemelhou-se ao de Khammassi et al. (2018), que encontraram $24,95 \pm 0,11$ mg EAG/ g OE para o funcho colhido em Aousja, na Tunísia. Para erva-doce, Rebey et al. (2019) encontraram 17,11 mg EAG/ g de erva-doce cultivada na Sérvia e 25,16 mg EAG/ g de erva-doce cultivada na Tunísia. Através dessas informações, pode-se indicar que a origem das plantas altera significativamente sua composição química, além dos métodos utilizados para secagem das sementes.

4. CONCLUSÃO

Pode-se perceber que para o funcho encontrou-se uma quantidade maior de compostos fenólicos e flavonoides quando comparados à erva-doce, o que pode ser relacionado a uma maior atividade antimicrobiana apresentada por este óleo. Porém, a atividade antimicrobiana foi abaixo do esperado. As sugestões para futuros trabalhos são conhecer a proveniência e o tempo de maturação da matéria prima, armazenar os óleos em frasco escuro, realizar os testes com baixa luminosidade e, se possível, com o menor tempo após a extração do óleo. Além disso, indica-se fazer uso do sulfato de sódio para obter uma maior pureza no óleo.

EXTRACTION AND EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM FENNEL AND FENNEL FOR APPLICATION IN FOOD

ABSTRACT: Fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*) and fennel (*Pimpinella anisum*) are aromatic plants that have been studied for their antimicrobial activity, which is highly sought after as it comes from natural sources. This activity is related to the presence of total phenolics and flavonoids. The present work aimed to extract the essential oil from each seed, study its antimicrobial activity and quantify the presence of total phenolics and flavonoids. Extraction was carried out by hydrodistillation in Clevenger equipment for 2 h and, for fennel, purification was carried out with excess sodium sulfate after obtaining the oil. The yield found for fennel was 3.10 % and 1.25 % for fennel (m/m). The antimicrobial activity was analyzed using the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration with the bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). For fennel, a halo of 8 mm was obtained for *E. coli* and 7 mm for *S. aureus*. For fennel, 7 mm was found for both bacteria. For the minimum inhibitory concentration, 90 mg/mL was obtained for both fennel and fennel, also for both bacteria. Total phenolics were quantified by colorimetric method, with Folin-Ciocalteu reagent, finding 24.1 ± 1.0 mg EAG/ g of fennel oil and 10.9 ± 1.0 mg EAG/ g of herb oil -sweet. For flavonoids, a colorimetric method was also used, with aluminum chloride, and 52.4 ± 1.6 mg EAQ/ g of fennel oil and 9.15 ± 0.37 mg EAQ/ g of fennel oil were found anise.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-REHEEM, M. A. T.; ORABY, M. M. Anti-microbial, cytotoxicity, and necrotic ripostes of *Pimpinella anisum* essential oil. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 335-340, dez. 2015.
- AHMAD, B. S.; TALIU, T.; SAAD, Z.; HIJAZI, A.; CERNY, M.; KANAAN, H.; CHOCR, A.; MERAH, O. Fennel oil and by-products seed characterization and their potential applications. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 92-98, jan. 2018.
- ALVES, L. V. **Análise dos constituintes químicos do óleo essencial de Eugenia speciosa Camb. (Myrtaceae)**. 115f. Tese (Magister Scientiae em Química Orgânica) - Curso de Pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.
- AMER, A. M.; ALY, U. I. Antioxidant and antibacterial properties of anise (*Pimpinella anisum* L.). **Egypt Parmaceut. J.**, v. 18, n. 1, p. 68-73.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARSLAN, N. GÜRBÜZ, B.; SARIJAN, E. O.; BAYRAK, A.; GÜMÜŞÇÜ, A. Variation in essential oil content and composition in turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 28, n. 3, 173-177, 2004.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, ago. 2004.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils: Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 58, ago. 2017.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 29th Ed.; CLSI Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2019; p. 296.

COSTA, A. S. G.; NUNES, M. A.; ALMEIDA, I. M. C.; CARVALHO, M. R.; BARROSO, M. F.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Teas, dierary supplements and fruit juices: a comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **LWT – Food Science and Technology**, v. 29, p. 324-328, 2012.

DIAO, W. R.; HU, Q. P.; ZHANG, H.; XU, J. G. Chemical composition, antibacterial activity and machanism of action of essential oil from seeds os fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 106-116, jan. 2014.

GOSWAMI, N.; CHATTERJEE, S. Assessment of free radical scavenging potential and oxidative DNA damage preventive activity of *Trachyspermum ammi* L. (Carom) and *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) seed extracts. **BioMed Research International**, v. 2014.

GULFRAZ, M.; MEHMOOD, S.; MINHAS, N.; JABEEN, N.; KAUSAR, R.; JABEEN, K.; ARSHAD, G. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 24, p. 4364-4368, dez. 2008.

KHAMMASSI, M.; LOUPASSAKI, S; TAZARKI, H; MEZNI, F.; SLAMA, A.; TLILI, N; ZAOUALI, Y; MIGHRI, H; JAMOUSSI, B; KHALDI, A. Variation in essential oil composition and biological activities of *Foeniculum vulgare* Mill. populations growing widely in Tunisia. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 3.

MARTINS, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zuxx (Pau-santo) do cerrado.** 116f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MOTA, A. C. S. **Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill.** 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2014.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, out. 2017. Special Issue. Choices of the Journal.

OUIS, N.; HARIRI, A. chemical analysis, antioxidant and antibacterial activities os aniseeds essential oil. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 86, n. 4, p. 337-348, 2021.

REBEY, I. B.; WANNES, W. A.; KAAB, S. B.; BOURGOU, S.; TOUNSI, M. S.; KSOURI, R.; FAUCONNIER, M. L. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Pimpinella anisum* L. accessions at different ripening stages. **Scientia Horticulturae**, v. 246, p. 453-461, fev. 2019.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A. H.; KHALEL, K. I. Antioxidant and antimicrobial activities os essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 437-445, jan. 2013.