



Influência da sazonalidade no teor de fenóis e nas atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato das folhas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-vermelha)

Influence of seasonality on phenol content and antioxidant and antimicrobial activities of the extract from the leaves of *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-vermelha)

T. T. Santos¹; G. O. Ribeiro²; A. E. Vale³; A. S. Jesus⁴; G. S. Marques³; J. M. C. Vale³; L. C. Souza Neta⁴; E. M. O. Ribeiro^{1*}

¹Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, 41150-000, Salvador-Bahia, Brasil

²Departamento de Nutrição, Centro Universitário de Excelência, 44100-000, Feira de Santana-Bahia, Brasil

³Departamento do Medicamento, Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador-Bahia, Brasil

⁴Departamento de Ciências Exatas e da Terra I, Universidade do Estado da Bahia, 41150-000, Salvador-Bahia, Brasil

*eribeiro@uneb.br

(Recebido em 06 de março de 2024; aceito em 26 de setembro de 2024)

Schinus terebinthifolius é amplamente usada na medicina tradicional brasileira por suas propriedades terapêuticas, como ação antimicrobiana, antioxidante e antifúngica. Embora essas propriedades sejam bem estudadas, a influência da sazonalidade ainda não é totalmente compreendida. Assim, este estudo visa avaliar o efeito da sazonalidade no teor de compostos fenólicos, nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas da planta. As amostras foram coletadas em Salvador, Bahia, em julho de 2021 e janeiro de 2022, maceradas em metanol e particionadas em hexano e acetato de etila, originando os extratos hexânico (STH) e acetato de etila (STA). Fenóis totais, flavonoides e taninos foram determinados pelos métodos de Folin-Ciocalteu, AlCl_3 e FeCl_3 , respectivamente. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método da microdiluição em caldo e a atividade antioxidante pelo método do sequestro de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazina). Os resultados obtidos confirmaram a atividade antioxidante dos STA inverno e verão e STH inverno. As concentrações inibitórias (IC_{50}) foram de 0,028mg/mL e 0,163mg/mL para STA inverno e STA verão, respectivamente. Estas frações foram as que apresentaram os maiores teores de fenóis e flavonoides totais. As frações STH, apenas a de inverno apresentou atividade com IC_{50} 0,875 mg/mL. Com relação à atividade antimicrobiana, todos os extratos da estação verão apresentaram atividade contra 4 das 5 cepas bacterianas testadas. STA verão demonstrou atividade bactericida e bacteriostática, enquanto STH inverno mostrou atividade bacteriostática. Com relação aos fungos testados, o STH verão apresentou atividade fungistática e fungicida frente a *Candida albicans* e *C. glabrata*.
Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*, ação antimicrobiana, sazonalidade.

Schinus terebinthifolius is widely used in traditional Brazilian medicine for its therapeutic properties, such as antimicrobial, antioxidant, and antifungal action. Although these properties are well studied, the influence of seasonality still needs to be fully understood. Thus, this study aims to evaluate the effect of seasonality on the content of phenolic compounds and the antioxidant and antimicrobial activities of the plant's leaves. Samples were collected in Salvador, Bahia, in July 2021 and January 2022, macerated in methanol, and partitioned into hexane and ethyl acetate, yielding hexane (STH) and ethyl acetate (STA) extracts. Total phenols, flavonoids, and tannins were determined by the Folin-Ciocalteu, AlCl_3 , and FeCl_3 methods, respectively. The antimicrobial activity was evaluated using the broth microdilution method, and the antioxidant activity was assessed using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) free radical scavenging method. The results obtained confirmed the antioxidant activity of winter and summer STA and winter STH. The inhibitory concentrations (IC_{50}) were 0.028 mg/mL and 0.163 mg/mL for STA winter and STA summer, respectively. These fractions were the ones that presented the highest levels of total phenols and flavonoids. Of the STH fractions, only the winter one showed activity with IC_{50} of 0.875 mg/mL. Regarding the antimicrobial activity, all the summer season extracts showed activity against four of the five bacterial strains tested. STA summer demonstrated bactericidal and bacteriostatic activity, while STH winter showed bacteriostatic activity. Regarding the fungi tested, STH summer showed fungistatic and fungicidal activity against *Candida albicans* and *C. glabrata*.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*, antimicrobial action, seasonality.

1. INTRODUÇÃO

Schinus terebinthifolius é uma espécie vegetal pertencente à família Anacardiaceae, popularmente conhecida como aroeira vermelha, aroeira da praia ou pimenta rosa. É uma planta nativa da América do Sul, amplamente utilizada na medicina tradicional brasileira para diversos fins, estando amplamente distribuída no país, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul [1, 2].

Seu amplo uso e suas propriedades terapêuticas têm despertado interesse na área científica e diversos estudos têm demonstrado atividades biológicas, tais como ações antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, larvicida e cicatrizante [3, 4]. A ação farmacológica da *S. terebinthifolius* pode ser atribuída aos metabólitos secundários presentes na espécie, tais como polifenóis, flavonoides, terpenos, taninos e saponinas que estão distribuídos nas folhas, cascas, frutos, flores e sementes [5].

Dentre essas atividades biológicas, merece destaque as ações antioxidante e antimicrobiana da *S. terebinthifolius*. A atividade antioxidante dessa espécie já foi comprovada por diversos estudos [6, 7], sendo atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos na planta [8-10]. Inclusive, esses mesmos compostos são também considerados os responsáveis pela propriedade antimicrobiana da aroeira.

Em relação à atividade antimicrobiana, as folhas de *S. terebinthifolius* apresentam a melhor ação antimicrobiana quando comparada a outras espécies da mesma família Anacardiaceae [11], destacando-se a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas [11-14] e fungos [12]. As propriedades terapêuticas da *S. terebinthifolium* já estão bastante elucidadas, entretanto, estudos com diferentes espécies vegetais têm mostrado que o estresse hídrico (aspecto sazonal) pode levar a diferentes respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas, uma vez que as mesmas estão constantemente expostas a uma variedade de estresses bióticos e abióticos [15, 16]. Segundo Langaroudi et al. (2023) [15], o estresse hídrico pode causar dano oxidativo, afetando os sistemas antioxidantes das plantas. Assim, avaliar o teor de compostos fenólicos, bem como a atividade antioxidante e antimicrobiana de *S. terebinthifolium*, é uma abordagem interessante, uma vez que a variável sazonalidade ainda não foi abordada na espécie em questão. Neste cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da sazonalidade no teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana das folhas de *S. terebinthifolius*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O material vegetal (folhas de *Schinus terebinthifolius*) foi coletado no Pavilhão de Aulas Fellipe Serpa (PAF I), no bairro de Ondina, em Salvador, Bahia no período do inverno (julho de 2021) e verão (janeiro de 2022). Durante os meses de coleta, os índices pluviométricos acumulados foram de 185 mm no inverno e 25 mm no verão. A temperatura média registrada no período foi de 25°C no inverno e 27°C no verão.

A identificação da espécie foi realizada por comparação com exsicata depositada no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). A exsicata está catalogada sob o código ALCB067907. Em atendimento ao previsto na Lei 13.123/2015 foi realizado o cadastro de acesso ao patrimônio genético no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código AB2E29A.

As folhas colhidas foram selecionadas manualmente, descartando as inconformes. Em seguida, foram submetidas à secagem em estufa (FANEM, modelo 320- SE) sob circulação de ar e em temperatura média de 40 °C durante 7 dias. Posteriormente foram trituradas em moinho tipo willey (TE-650/Tecnal) e armazenadas em sacolas plásticas à temperatura ambiente (~25 °C).

2.1.1 Preparação dos extratos

O material triturado referente aos períodos do inverno (198,5220 g) e verão (230,7889 g) foi macerado à temperatura ambiente (~25 °C) com metanol P.A. e, em seguida, filtrado, visando à obtenção do extrato metanólico, cujo rendimento foi de 40,2117 g (inverno) e 42,2270 g (verão). O solvente foi adicionado em volume suficiente para manter a matriz imersa durante a extração. O material particulado foi ressuspensão em metanol por mais duas vezes consecutivas a cada 72 h e, em seguida, o filtrado obtido em cada extração foi somado, concentrado no aparelho rotaevaporador (BUCHI-R11, SWITZERLAND) e acondicionado em frascos de vidro previamente pesados. Sequencialmente, o extrato bruto metanólico foi submetido à partição com Hexano:Metanol/Água (9:1), denominada a fase resultante, STH e Acetato de etila: Água (1:1), denominada a fase resultante, STA.

2.2 Caracterização química

2.2.1 Fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais nos extratos foi executada com o reagente Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton et al. (1999) [17], com adaptações. Foram adicionados 20 µL de cada um dos extratos de concentração 300 µg/mL nos poços da microplaca, com 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluição 1:4). Após agitação vigorosa (1 min) e descanso de 4 minutos a 25 °C, 75 µL de uma solução de carbonato de sódio 10% foram adicionados e feita agitação por 1 minuto. Após 2 horas de incubação, na ausência de luz e em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 750 nm em comparação com uma curva padrão obtida com ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

2.2.2 Flavonoides

O teor de flavonoides totais dos extratos foi determinado pelo método do cloreto de alumínio (AlCl₃) adaptado por Chatatikun e Chiabchalard (2017) [18]. Os extratos foram dissolvidos em etanol 80% e 50 µL de extrato, de concentração 1 mg/mL foi adicionado à microplaca com 10 µL do reagente AlCl₃ (10%), seguido da adição de 150 µL de etanol (95%) e 10 µL de acetato de sódio (1M). Após 40 minutos de repouso na ausência de luz em temperatura ambiente foi realizada a leitura da absorbância a 415 nm. O teor de flavonoides foi expresso em mg equivalentes de quercetina por grama de extrato.

2.2.3 Taninos

O teor de taninos nos extratos foi determinado segundo método utilizado por Falcão e Araújo (2013) [5] em que 2,0 mL dos extratos foram somados a 5,0 mL de água destilada e 2 gotas de cloreto férrico a 10%. A coloração resultante indica a presença de taninos hidrolisáveis (coloração azul) ou presença de taninos condensados (coloração verde).

2.3 Avaliação da atividade antioxidante por meio do sequestro dos radicais livres

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio do método utilizado por Almeida et al. (2006) [19] com modificações. Os extratos foram diluídos em metanol obtendo a concentração de 1,0 mg/mL, e em seguida, foram realizadas diluições seriadas nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 e 0,015625 mg/mL. Uma alíquota de 50 µL de cada uma das amostras foi colocada em microplaca de Elisa 96 poços com 250 µL da solução de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazina) a 200 mM e incubadas por 40 minutos, em local com ausência de luz. O padrão utilizado foi o hidroxitolueno de butila (BHT) e como branco apenas o metanol. Em

seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Após a leitura, foi calculada a porcentagem de atividade antioxidante, em que:

$$\% \text{ antioxidante} = \frac{(\text{Abs do DPPH} - \text{Abs da amostra})}{(\text{Abs DPPH})} \cdot 100$$

O experimento foi realizado em triplicata e a concentração inibitória ou concentração equivalente (IC_{50}) foi calculada através da equação da reta. Segundo Loganayaki et al. (2013) [20] a IC_{50} é a quantidade de extrato necessária para inibir a concentração inicial de DPPH em 50%, ou seja, uma atividade antioxidante significativa é indicada por um baixo valor de IC_{50} .

2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

2.4.1 Linhagens celulares

As linhagens utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana, adquiridas da Coleção de Culturas Tropical (CCT)/ Fundação André Tosello, foram: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *B. cereus* (CCT 0096), *S. aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 0090), *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. glabrata* (CCT0728). As culturas foram mantidas em meio sólido: bactérias em ágar nutriente e leveduras em extrato de malte. As culturas foram incubadas em estufa por um período de 24h (36 °C) e 72 h (26 °C), respectivamente.

2.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada segundo normas técnicas do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), com pequenas modificações [21, 22]. Foram utilizados caldo nutriente e extrato de malte como meio de cultura para crescimento de bactérias e leveduras, respectivamente. Os extratos foram dissolvidos em solução aquosa de 20% de DMSO (v.v⁻¹). Para o teste de suscetibilidade antimicrobiana adicionou-se em uma placa de Elisa 96 poços, 100 µL de meio de cultivo apropriado em cada poço e 100 µL de cada fração do extrato (inverno e verão). Foram utilizados 100 µL do controle positivo (antibiótico ou antifúngico) e 100 µL da mistura da solução do DMSO como controle negativo. Após a diluição em série, as concentrações celulares finais foram ajustadas, comparando a turbidez da suspensão do microrganismo em água com o padrão na escala 0,5 de McFarland ($1 - 2 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$), 100 µL desta suspensão foi transferida para cada poço da placa de Elisa. A concentração dos extratos das folhas de *S. terebinthifolius* variou de 200– 15,63 µg mL⁻¹. As placas foram incubadas a 36 °C (24 h) e 26 °C (72 h) para crescimento de bactérias e fungos, respectivamente. O valor da concentração inibitória mínima (CIM) de cada amostra foi determinado como a menor concentração que inibiu visualmente o crescimento do microrganismo. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os extratos foram considerados ativos quando inibiram o crescimento microbiano em concentrações inferiores à maior concentração testada (200 µg mL⁻¹). Os compostos benzilpenicilina (100 µg mL⁻¹), gentamicina (100 µg mL⁻¹), ciclopiroxolamina (400 µg mL⁻¹) e anfotericina B (250 µg mL⁻¹) foram utilizados como controle positivo.

2.4.3 Determinação da concentração microbicida

A determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) foi realizada a partir dos poços de Elisa que apresentaram ausência de turbidez, na leitura do ensaio de microdiluição. Destes poços, retirou-se 10 µL e inoculou-se em placas de Petri com ágar nutriente, para bactérias, e extrato de malte, para levedura. Em seguida, as placas foram incubadas em temperaturas e períodos apropriados para cada microrganismo. Após incubação, a menor concentração testada na qual havia ausência de crescimento microbiano visível foi determinada como a CMM.

2.5 Análise estatística

Os dados das atividades antioxidante e antimicrobiana foram submetidos à análise de variância no software R (versão 4.3.0). O nível de significância adotado foi menor que 5%. As ferramentas disponíveis no Origin 2023b® também foram utilizadas, principalmente para construção e visualização gráfica e cálculos de valores de média.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização química

Os teores de fenóis totais e flavonoides totais encontrados nos extratos, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Teores de fenóis totais e flavonoides totais dos extratos.

Extratos	Concentração de metabólitos	
	Fenóis totais EAG [mg.g ⁻¹]	Flavonoides totais EQ [mg.g ⁻¹]
STA verão	609	34,04
STH verão	18,52	0,66
STA inverno	302	34,2
STH inverno	41,2	25,53

Os resultados obtidos demonstraram que os maiores percentuais de fenóis totais, calculados em equivalentes de ácido gálico (EAG) foram encontrados nos extratos STA verão e STA inverno. Este resultado corrobora com a literatura, que menciona que o tipo de solvente utilizado na extração interfere significativamente no tipo e conteúdo do metabólito extraído [23]. Sendo o acetato de etila um solvente de natureza polar, o mesmo terá maior afinidade por compostos polares, a saber, os compostos fenólicos, extraíndo-os, dessa forma, com mais facilidade.

Os extratos STH apresentam percentuais menores, tendo em vista que o hexano apresenta baixa polaridade, e consequentemente extrairá menos os metabólitos de natureza polar. Estudos confirmam que a família Anarcadiaceae, família à qual pertence a *S. terebinthifolius* é caracterizada, do ponto de vista químico, pela presença de compostos fenólicos [24].

O teor de flavonoides calculado em equivalentes de quercetina, EQ, apresentado na Tabela 1, segue praticamente o mesmo padrão de resultado para a fração STA, onde observa-se que tais extratos, tanto do inverno como do verão, apresentaram teores de 34,2 e 34,04 mg EQ/g de extrato, respectivamente. O STH apresentou menor conteúdo de flavonoides e isso pode ser explicado devido às propriedades de polaridade desse solvente, ou seja, um extrato hexânico é conhecido como um extrato apolar, portanto é menos propenso a extrair compostos polares como fenóis totais e flavonoides.

A presença de taninos na amostra também foi avaliada e os resultados estão na Tabela 2. Nela é possível constatar a presença dos taninos em todas as amostras testadas exceto na fração STH inverno. A fração STA apresentou taninos hidrolisáveis e a fração STH verão apresentou taninos condensados. O teste foi de natureza qualitativa, com o objetivo apenas de detectar presença ou ausência do metabólito. As frações STA, as mais polares, apresentaram coloração fortemente azulada, o que indica maiores concentrações de taninos hidrolisáveis seguida da fração STH que apresentou coloração levemente esverdeada, indicando a presença de taninos condensados.

Tabela 2: Teste colorimétrico para Taninos.

Amostras	Taninos	
	Condensados	Hidrolizáveis
STA verão		+++
STH verão	+	
STA inverno		+++
STH inverno	-	-

3.2 Atividade antioxidante

A Figura 1 mostra os resultados dos percentuais da atividade antioxidante das fases STH e STA, inverno e verão, tais percentuais foram obtidos após leitura das absorvâncias (Abs) das amostras em concentrações decrescentes (1,0 a 0,0625 mg/mL).

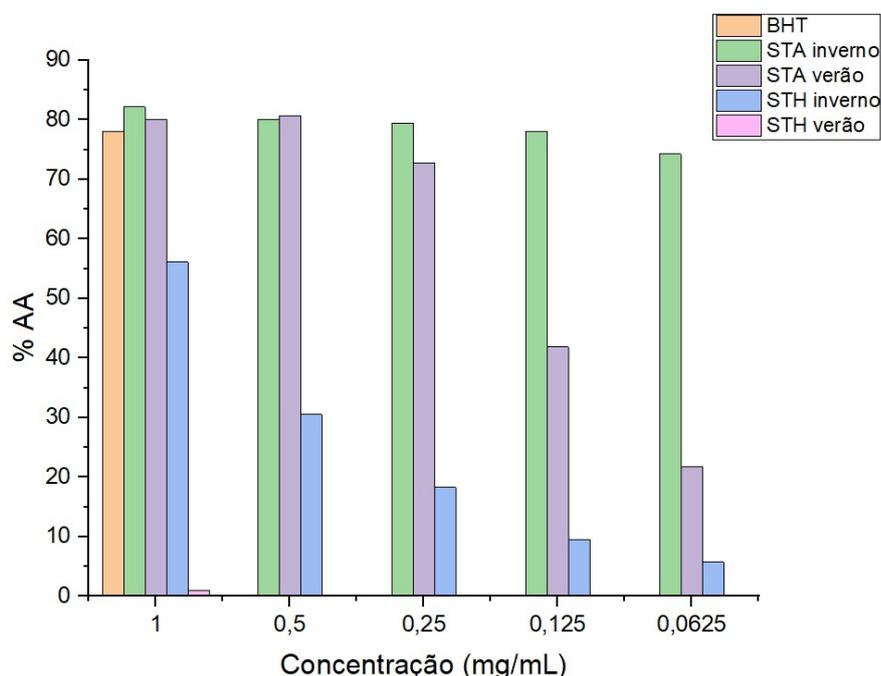


Figura 1: Porcentagem de atividade antioxidante das fases acetato de etila e hexânica.

Os melhores resultados foram observados para as frações STA inverno e STA verão. Este resultado confirma o acetado de etila, substância polar, como o melhor extrator dos compostos antioxidantes. Comparando as frações STA inverno e STA verão, é possível perceber que a fração inverno apresentou atividade antioxidante elevada, até em concentrações muito baixas, de 0,03125 mg/mL (dados não apresentados neste estudo). Rocha et al. (2019) [25] também encontraram atividade antioxidante nos extratos metanólicos das folhas da aroeira através de diversas metodologias, como DPPH, beta-caroteno, ABTS e FRAPES, o que corrobora com os resultados deste trabalho.

Comparando a atividade antioxidante da fração STA verão, com a fração STA inverno, percebe-se que nas concentrações iniciais (1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL) os valores das duas frações são muito próximos, no entanto, à medida que as concentrações se reduzem, os valores da STA verão diminuem bastante em comparação a STA inverno. À concentração de 0,125mg/mL, a atividade antioxidante do STA é aproximadamente metade da fração STA inverno e à concentração de 0,0625 mg/mL esta atividade se reduz a um terço da fração STA inverno.

A fração STH inverno apresentou menor potencial antioxidante em relação a fração STA, apresentando um percentual de 56% na maior concentração testada (1,0 mg/mL). A fração STH verão não apresentou atividade antioxidante relevante, 0,99% na maior concentração. Estes dados

demonstram que o solvente utilizado, hexano, de natureza apolar, não consegue extrair eficazmente os compostos fenólicos, cuja natureza é polar. Haminiuk et al. (2014) [23] também reforçam que as propriedades físico-químicas do solvente utilizado na extração, têm forte influência nos compostos extraídos, corroborando com o resultado encontrado.

A atividade antioxidante tem sido, em vários estudos, frequentemente associada a ação dos compostos fenólicos [26-29]. Di Stasi e Hiruna-Lima (2002) [24] descreve que a ação antioxidante é devida às propriedades químicas desses compostos e à capacidade dos mesmos de neutralizar os radicais livres e outros agentes oxidantes no organismo.

Falcão et al. (2015) [30] reforçaram que a ação farmacológica da *S. terebinthifolium* pode ser atribuída aos metabólitos secundários presentes na espécie, a saber, polifenóis, flavonoides, terpenos, taninos e saponinas que estão distribuídos nas folhas, cascas, frutos, flores e sementes. Silva et al. (2015) [6] destacaram que os principais metabólitos secundários encontrados nas folhas de *S. terebinthifolius*, parte da planta estudada nesta pesquisa, são os glicosídeos cardiotônicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.

Com relação à sazonalidade, Santos et al. (2010) [31] afirmam que o estresse hídrico interfere significativamente na concentração de muitos metabólitos da planta. Já a diminuição do processo fotossintético promove a ativação do metabolismo secundário como forma de proteção ao estresse. Gobbo Neto e Lopes (2007) [32] corroboram com o resultado encontrado neste trabalho, visto que afirmam que o efeito da seca no conteúdo de metabólitos das plantas é, muitas vezes, dependente do nível de estresse, sendo que a curto prazo parecem levar a uma produção maior enquanto a longo prazo o que se observa é o efeito oposto.

Sobre a confiabilidade dos dados, a correlação linear R^2 com valores em torno de 0,99 representam a linearidade da reta; pequenas distorções podem ter sido ocasionadas por erros no equipamento. Os R^2 abaixo, mostram que os resultados obtidos apresentaram uma linearidade de aproximadamente 99%.

A partir das equações da reta para cada uma das frações testadas, calculou-se as IC_{50} cujos valores estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Determinação da atividade antioxidante das amostras STA e STH, verão e inverno, expressa em mg/mL de extrato capaz de causar inibição de 50% (IC_{50}).

Extratos	IC_{50} [mg/ml]
STA verão	0,163
STA inverno	0,028
STH inverno	0,875

Analisando a Tabela 3, é possível concluir que as frações STA foram as que apresentaram a melhor atividade antioxidante, visto que elas exibem a menor IC_{50} , seguida da fração STH inverno. Analisando estes dados em relação ao aspecto sazonalidade, observa-se que a fração STA inverno apresentou a menor IC_{50} e, portanto, a maior atividade antioxidante. Isso confirma a importância da sazonalidade como uma variável significativa na atividade antioxidante da *S. terebinthifolius*. Ou seja, a sazonalidade pode influenciar no estresse hídrico das plantas o que, por sua vez, afeta a concentração de metabólitos e, por conseguinte, sua atividade biológica.

3.3 Atividade Antimicrobiana

A Tabela 4 mostra a atividade antimicrobiana da espécie *S. terebinthifolius* e os resultados demonstraram que os dois extratos cujas folhas foram colhidas no inverno mostraram similaridade bacteriostática frente ao *B. subtilis*, no entanto, observou-se que o extrato hexânico mostrou efeito bactericida para o *B. subtilis* (CMM =125 μ g/mL) considerável quando comparado ao extrato acetato (CMM > 500 μ g/mL).

Tabela 4: Atividade antimicrobiana da *Schinus terebinthifolius* (Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Amostra	Bc		Bs		Sa		Pa		Ec		Cg		Ca	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	MFC	CIM	MFC
STH inv	31,3	500	62,5	125	500	>500	>500	nt	>500	nt	>500	nt	>500	nt
STA inv	62,5	500	62,5	>500	>500	>500	>500	nt	>500	nt	>500	nt	>500	nt
STA ver.	31,3	>500	31,3	>500	15,6	>500	>500	nt	>500	nt	>500	nt	>500	nt
STH ver.	31,3	>500	31,3	>500	>500	>500	>500	nt	>500	nt	125	250	250	250
Loprox											3,2	>50	6,3	>50
Gentamicina							0,8	nt	3,2	nt				
Tetraciclina	<0,4	1,6	<0,4	1,6	<0,4	>50								

Legenda: Bc= *B. cereus*; Bs = *B. subtilis*; Sa = *S. aureus*; Pa = *P. aeruginosa*; Ec = *E. coli*; Cg = *C. glabrata*; Ca = *C. albicans*; nt = amostras não testadas, devido a ausência de efeito antimicrobiano no teste de microdiluição em caldo; CIM concentração inibitória mínima; CMM concentração microbicida mínima; MFC concentração fungicida mínima; O controle negativo H₂O:DMSO 5% v v⁻¹, após as diluições não foi tóxico para os microrganismos testados.

Os extratos obtidos no verão apresentaram mesmos valores de MIC frente ao *B. cereus*, o que corrobora com o estudo de Binatti et al. (2016) [33]. O extrato acetato obtido no verão foi o único que apresentou atividade bacteriostática contra *S. aureus*, contrastando com o estudo de Colacite (2015) [34] que constatou atividade bactericida do extrato da aroeira frente ao *S. aureus*, no entanto, o estudo não mencionou o solvente utilizado na extração nem tampouco o período da coleta.

Com relação aos fungos testados, o único extrato que apresentou atividade foi o STH verão e o mesmo teve efeito fungistático e fungicida frente a *C. albicans* e *C. glabrata*, atividade corroborada pelo estudo realizado por Oliveira et al. (2010) [35], no qual o extrato etanólico das cascas, caule e folhas da espécie foram testados frente a *C. albicans* e também apresentaram atividade antifúngica.

Bactérias Gram negativas exibem maior resistência aos antimicrobianos quando comparadas às Gram-positivas. Esta resistência é atribuída à presença de septo exterior unificado, complexo existente nas bactérias Gram negativas e que reduz a taxa de penetração de compostos antimicrobianos e compostos hidrofóbicos, a exemplo, os óleos essenciais [36]. Fato que pode justificar e corroborar a atividade bactericida/bacteriostática dos extratos frente às bactérias gram-positivas e não efetividade frente às bactérias gram negativas.

Sobre a atividade contra as bactérias gram positivas, *S. aureus* e *B. cereus*, verificada neste trabalho, a mesma pode ser confirmada em um estudo de Degaspari et al. (2005) [13], que observou que o extrato alcoólico do fruto da aroeira apresentou efeito inibitório frente às mesmas cepas.

Para Wang et al. (2017) [37], grande parte dos compostos antibacterianos age inibindo a enzima DNA topoisomerase, com essa inibição interfere na replicação de DNA e, consequentemente, na sua expressão. Partindo dessa premissa, o estudo realizado por eles conseguiu provar que a isoflavona obtida da soja inibia significativamente a atividade da DNA topoisomerase pela formação de complexos que interferem nas ligações com a enzima.

Outro mecanismo de ação, associado aos flavonoides é a alteração da permeabilidade da membrana celular. A membrana plasmática bacteriana é responsável por diversas funções, sem as quais a bactéria não sobreviveria, respiração, regulação osmótica e processos de transporte, por exemplo. No entanto, para executar estas funções a membrana deve estar intacta, pois sua ruptura pode causar distúrbios metabólicos e levar as bactérias à morte [38]. A capacidade dos flavonoides em interagir com a membrana bacteriana por conta de sua lipofilicidade é um fator de suma importância na sua atividade antimicrobiana. Devido a essa capacidade, os flavonoides destroem ou alteram a permeabilidade da membrana e assim levam à morte as bactérias.

Sobre a menor efetividade antimicrobiana dos extratos obtidos da espécie colhida no inverno, depreende-se que, no período, o teor de compostos fenólicos, possíveis metabólitos secundários responsáveis pela atividade da espécie, foi menor (Tabela 1), o que justificaria esta baixa efetividade.

Segundo Taiz e Zeiger (2004) [39], o menor conteúdo de metabólitos secundários sob baixos níveis de radiação solar no inverno são explicados pelo fato de as reações biossintéticas para a produção dos mesmos dependerem de esqueletos carbônicos oriundos de processos de fotossíntese e de compostos energéticos que participam da regulação dessas reações. Assim, uma maior produção de metabólitos secundários se daria sob altos níveis de radiação, o que não acontece no período do inverno.

Além da radiação, outro fator que deve ser considerado na produção de metabólitos secundários é o estresse hídrico. O estresse hídrico é qualquer alteração na condição ótima de disponibilidade de água (excesso ou escassez). Quando há redução da disponibilidade de água, ocorre mudança na concentração de muitos metabólitos como carboidratos e aminoácidos [31]. Os estômatos tendem a se fechar, ocasionando uma diminuição na difusão de CO₂, que por sua vez, leva à diminuição da fotossíntese. Esta diminuição do processo fotossintético, promove a ativação do metabolismo secundário como forma de proteção ao estresse [31].

Selmar e Kleinwächter (2013) [40] afirmam que as concentrações de metabólitos secundários tendem a aumentar significativamente em planta em condições de seca. Já Gobbo Neto e Lopes (2007) [32] afirmam que o efeito da seca no conteúdo de metabólitos das plantas é, muitas vezes, dependente do nível de estresse, sendo que a curto prazo parecem levar a uma produção maior, enquanto a longo prazo, o que se observa é o efeito oposto.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que a sazonalidade é uma variável importante nas atividades antioxidante e antimicrobiana da aroeira, visto que foram observadas variações nas atividades nos períodos avaliados.

Correlacionando as atividades antioxidante e antimicrobiana testadas neste estudo, verificou-se os maiores percentuais de atividade antioxidante nos extratos do inverno, já a maior atividade antimicrobiana foi observada nos extratos obtidos no verão. A atividade antioxidante e a antimicrobiana são atividades com características distintas e, portanto, a constatação do potencial de uma delas nos extratos não implica necessariamente na presença da outra. Isto sugere que a atividade biológica pode não estar diretamente relacionada ao conteúdo de fenólicos ou flavonoides, tese defendida e corroborada por estudos mencionados, mas pode ser resultado de um efeito sinérgico desses compostos com outros metabólitos presentes na espécie vegetal.

Os resultados encontrados no presente estudo podem contribuir para definição de um melhor período de colheita, visando a obtenção de um material vegetal com maior atividade biológica, bem como servir para aprofundamento de questões não totalmente esclarecidas até o momento.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Capes, ao CNPq, à FAPESB pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lorenzi H. Árvores brasileiras. 4. ed. Nova Odessa (SP): Plantarum; 2008.
2. Azevedo CF, Quirino ZGM, Bruno RLA. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). Rev Bras Pl Med. 2015;17(1):26-35. doi: 10.1590/1983-084X/11_090
3. Gomes FS, Procópio TF, Napoleão TH, Coelho LCBB, Paiva PMG. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. J Appl Microbiol. 2013;114(3):672-79. doi: 10.1111/jam12086
4. Silva AG, Almeida DL, Ronchi SN, Bento AC, Scherer R, Ramos AC, et al. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolius* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). Parasit Vectors. 2010;3(1):79-83. doi: 10.1186/1756-3305-3-79
5. Falcão L, Araujo MEM. Tannins characterization in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. J Cult Herit. 2013;12:149-56. doi: 10.1016/j.culher.2010.10.005

6. Silva LE, Quadros DA, Maria Neto AJ. Ethnobotanical and ethnopharmacological study of medicinal plants used in the region of Matinhos-Parana. *Cienc Nat.* 2015;37(2):266-76. doi: 10.5902/2179460X15473
7. Costa COS, Ribeiro PR, Castro RD, Fernandez LG. Avaliação da atividade antimicrobiana em amostras comerciais de *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha). *Cien Med Bio.* 2013;12(3):312-17. doi: 109771/cmbio.v12i3.7093
8. Tagliacruz D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* 2010;120(2):599-606. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.030
9. Burin VM, Lima NEF, Panceri PC, Bordignon-Luis MT. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchem J.* 2014;114:155-63. doi: 10.1016/j.microc.2013.12.014
10. Silva MM, Iriuguichi EKK, Kassuia CAL, Vieira MC, Foglio MA, Carvalho JE, et al. *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. *Braz J Pharmacogn.* 2017;27(4):445-52. doi: 10.1016/j.bjp.2016.12.007
11. Sá Junior PF, Muniz EB, Pereira NA, Oliveira MAS. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Anacardiaceae. *Rev Cien Med Bio.* 2016;15(1):56-61. doi: 10.9771/cmbio.v15i1.14098
12. Guerra MJM, Barreiro ML, Rubalcaba Y, Rodriguez Z. Actividad Antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (COPAL). *Rev Cuba Pl Med.* 2000;5(1):23-5.
13. Degaspari CH, Waszczyński N, Prado MRM. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciênc Agrotec.* 2005;29(3):617-22. doi: 10.1590/S1413-70542005000300016
14. Muhs A, Lyles JT, Parlet CP, Nelson K, Kavanaugh JS, Horswill AR, et al. Virulence inhibitors from brazilian peppertree block quorum sensing and abate dermonecrosis in skin infection models. *Sci Rep.* 2017;7(1):42275. doi: 10.1038/srep42275
15. Langaroudi IK, Piri S, Chaeikar SS. Evaluating drought stress tolerance in different *Camellia sinensis* L. cultivars and effect of melatonin on strengthening antioxidant system. *Sci Hort.* 2023;317:111517. doi: 10.1016/j.scientia.2022.111517
16. Valliyodan B, Nguyen HT. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2006;9(2):189-95. doi: 10.1016/j.pbi.2006.01.019
17. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu. *Methods Enzymol.* 1999;299:152-78. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
18. Chatatikum M, Chiabchalard A. The plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):487. doi: 10.1186/s12906-017-1994-7
19. Almeida JMD, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b- caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *J Food Sci Technol.* 2006;26(2):446-52. doi: 101590/S0101-20612006000200031
20. Loganayaki N, Siddhuruju P, Subramanian K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *J Food Sci Technol.* 2013;50(4):1-9. doi: 10.1007/S13197-011-0389-x
21. Araujo FM, Dantas MASM, Silva LS, Aona LYSA, Tavares IF, Souza Neta LC. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. *Ind Crops Prod.* 2017;105:203-6. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.016
22. Caires TA, Silva AMS, Vasconcelos VM, Affe HMJ, Souza Neta LC, Boness HVM, et al. Biotechnological potential of *Neolyngbya* (Cyanobacteria), a new marine benthic filamentous genus from Brazil. *Algal Res.* 2018;36:1-9. doi: 10.1016/j.algal.2018.10.001
23. Haminiuk CWI, Plata-Oviedo MSV, Matos G, Carpes ST, Branco IG. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. *J Food Sci Technol.* 2014;51(10):2862-6. doi: 10.1007/s13197-012-0759-z
24. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Unesp; 2002.
25. Rocha PS, Boleti APA, Vieira MC, Carollo CA, Silva DB, Estevinho LM, et al. Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2019;220:36-46. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.02.007
26. Cunha AL, Moura KS, Barbosa JC, dos Santos AF. Fundamentos químicos da ação dos radicais no organismo. *Div J.* 2016;1(1):8-13. doi: 1017648/diversitas-journal-v1i1450
27. Fedel-Miyasato LES, Kassuya CAL, Auharek SA, Formaggio ASN, Cardoso CAL, Mauro MO, et al. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials

- from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. Rev Bras Farmacogn. 2014;24(5):565-75. doi: 10.1016/j.bjp.2014.08.004
28. Veber J, Petrini LA, Andrade LB, Siviero J. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos etanólicos de jambolão (*Syzygium cummi* L.). Rev Bras Pl Med. 2015;17(2):267-73. doi: 10.1590/1983-084X/12_181
 29. Vizzoto M, Krolow AC, Weber GEB. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas (RS): Embrapa Clima Temperado; 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/886074/metabolitos-secundarios-encontrados-em-plantas-e-sua-importancia>
 30. Falcão M, et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e suas propriedades na medicina popular. Revista Verde. 2015;10(5):23-7.
 31. Santos CF, Lima GPP, Morgado, LB. Tolerância e caracterização bioquímica em feijão-caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração. Naturalia. 2010;33:34-44.
 32. Gobbo Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím Nova. 2007;30(2):374-81. doi: 10.1590/S0100-40422007000200026
 33. Binatti TT, Geromel MR, Fazio MLS. Ação antimicrobiana de especiarias sobre o desenvolvimento bacteriano. Hig Aliment. 2016;30(260/261):105-8.
 34. Colacite J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica dos extratos das plantas: *S. terebinthifolius*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellanae*, *Anadenanthera colubrina* (Vell) BRENAN. Saúde e Pesquisa. 2015;8(3):509-16. doi: 10.177651/1983-1870.2015v8n3p509-516
 35. Oliveira AF, Batista JS, Paiva ES, Silva AE, Farias YJMD, Damasceno CAR, et al. Evaluation of the Brazilian ironwood (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) healing activity on cutaneous lesions of goats. Rev Bras Pl Med. 2010;12(3):302-10. doi: 10.1590/S1516-05722010000300007
 36. Farzaneh V, Carvalho IS. A review of the health benefits potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. Ind Crops Prod. 2015;65:247-58. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.10.057
 37. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. Int J Nanomedicine. 2017;12:1227-49. doi: 10.2147/IJN.S121956
 38. Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(8):3132-42. doi: 10.1128/AAC.00124-10
 39. Taiz L, Zeiger RE. Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2009.
 40. Selmar D, Kleinwachter M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. Ind Crops Prod. 2013;42:558-66. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.06.020