

# Influência dos Processos de Autoclavação e Microondas Sobre a Carga Microbiana e Teor de Polifenóis e Taninos Totais das Cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi

## The Influence of the Autoclavation and Microwave Processes on the Microbiological Charge and the Polyphenols and Total Tannins Contents from the Barks of *Schinus terebinthifolius* Raddi

<sup>1</sup>Edilene P. Lavor; <sup>1</sup>Ana Lourdes R. Santos; <sup>2</sup>Fernanda N. Raffin; <sup>2\*</sup>Túlio Flávio A. L. Moura

<sup>1</sup>Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal, RN – Brasil

<sup>2\*</sup>Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, R. Gal. Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, CEP 59010-180 Natal, RN – Brasil.

\*Correspondência: email: moura@ufrnet.br ou mouratf@hotmail.com

### Palavras chave:

*Schinus terebinthifolius* Raddi; autoclavação; microondas; taninos e polifenóis totais; Carga microbiana.

### Keywords:

*Schinus terebinthifolius* Raddi; autoclavation; microwave; total content of polyphenols and tannins; microbial charge.

## Resumo

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida como aroeira da praia, é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de lesões e úlceras de pele e mucosas, infecções do sistema respiratório, digestivo e geniturinário. Sendo um dos maiores problemas enfrentados pela indústria de fitoterápicos a contaminação microbiana das matérias-primas, este trabalho objetivou avaliar a influência dos processos de autoclavação e microondas sobre a contaminação microbiológica e teor de taninos e flavonóides totais do pó e de extratos hidroalcoólicos de aroeira. Os extratos foram obtidos por maceração na proporção de 1:10 de planta/solvente com álcool a 40%, 50%, 60% e 70%. Os métodos microbiológicos utilizados foram o de contagem de microrganismos em placa por *pour plate* e o da pesquisa de patógenos, analisando em triplicata cada uma das amostras. Nos pós autoclavados houve apenas crescimento bacteriano ( $0,12 \times 10^2$  UFC/g). No processo por microondas ocorreu crescimento para bactérias ( $0,50 \times 10^2$  UFC/g) e fungos ( $0,10 \times 10^2$  UFC/g). Os pós quando não tratados, apresentaram maior crescimento de bactérias ( $3,68 \times 10^2$  UFC/g) e fungos ( $0,26 \times 10^2$  UFC/g). Os extratos tratados com álcool apresentaram menor contaminação microbiana. O processo de esterilização por autoclave não acarretou redução de polifenóis e taninos totais.

## Abstract

The *Schinus terebinthifolius* Raddi, known as aroeira da praia, is used in traditional medicine for the treatment of lesions and ulcers in the skin and mucosa, infections in the respiratory threat, digestive and urinary systems.





One of the biggest problems faced by the fitoherapeutic industry is the microbial contamination of the drug. This work aimed at assessing the influence of the autoclavation and microwave processes on the microbial contamination, and the total content of tannins and flavanoids of the powder and hydroalcoholic extracts of the aroeira. The extracts were obtained by maceration in the proportion of 1:10 of plant/solvent with alcohol at 40%, 50%, 60% and 70%. The microbiologic methods used were the microorganism count on a dish by pour plate and the pathogeneus research, performing a triplicate analysis of the samples. On the microbial count after autoclavation, no fungal growth was observed, but there was bacterial growth ( $0.12 \times 10^2$  UFC/g). In the microwave process bacterial growth occurred ( $0.50 \times 10^2$  UFC/g) as well as fungal growth ( $0.10 \times 10^2$  UFC/g). The powder, when untreated, show greater bacterial growth ( $3.68 \times 10^2$  UFC/g) and fungi ( $0.26 \times 10^2$  UFC/g). The extracts treated by alcohol showed less microbial contamination. The sterilization process by autoclavation did not lead to a decrease in the polyphenols and total tannins contents.

## Introdução

Calixto (2001) relata que os vegetais têm sido utilizados como fonte alimentícia e medicamentosa. As diversas enfermidades são tratadas através de chás, infusos, decoctos, macerados, sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e unguentos, que são preparados a partir de determinadas partes das plantas, ou drogas vegetais. No entanto, essas drogas podem conter um grande número de fungos e bactérias, geralmente, provenientes do solo, pertencentes à microflora natural de certas plantas ou mesmo introduzidas durante a manipulação. Dependendo das condições de manejo, secagem e armazenamento, os microrganismos podem desenvolver-se, intensificando a contaminação (WHO, 1998).

A contaminação por fungos e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) tem sido observada, e foi demonstrado que vem afetando a qualidade microbiológica das drogas vegetais, evidenciando a necessidade de se estabelecer normas de boas práticas de cultivo, coleta e certificação de fornecedores (Dall'Ágnol e Nascimento, 1998).

Os limites de contaminação microbiana em drogas vegetais dependem do tipo de material vegetal e de seu uso. Em seu estado cru, não tratado, considerando a coleta em condições higiênicas e processamento, tais como procedimentos de descontaminação química ou física (aquecimento, extração com álcool e outros), podem apresentar limites de contaminação de no máximo  $10^4$  UFC/g para *Escherichia coli* e  $10^5$  UFC/g para fungos filamentosos. Para uso tópico, os limites são de no máximo  $10^7$  UFC/g para bactérias aeróbicas,  $10^2$  UFC/g para *Escherichia coli* e de  $10^4$  UFC/g para fungos (leveduras e filamentosos), não sendo admitida a presença de *Salmonella sp.* (WHO, 1998; Brasil, 1999). A Farmacopéia Européia (2002) apresenta como limites ausência de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e

limites para bactérias aeróbicas de  $10^5$  UFC/g e para fungos de  $10^4$  UFC/g.

Quanto ao produto final, além da qualidade microbiana adequada para comercialização, o medicamento ou cosmético deve ser seguro ao consumidor, garantindo a manutenção da qualidade durante o uso, conforme a eficácia do conservante e outros adjuvantes, porém há vários fatores relacionados às formulações que podem afetar o comportamento de conservação dos produtos, como, pH do produto, adsorção pelo material de acondicionamento, coeficiente de partição, presença de tensoativos, agentes umectantes, temperatura de fabricação e a estocagem (Ohara, Fischer e Saito, 1991; Ohara e Saito, 1984 a,b).

Na matéria-prima vegetal, o composto ou classe de compostos químicos, como por exemplo, alcalóides, flavonóides, ácidos graxos e outras substâncias presentes na matéria-prima, preferencialmente, tendo correlação com o efeito terapêutico é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal ou do fitoterápico, e é denominado marcador químico (Brasil, 2004).

Na casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi (S. t.), Anacardiaceae ("aroeira" ou "Brazilian Peppertree"), os taninos representam um dos principais constituintes, sendo considerados como marcadores químicos no controle de qualidade dessa espécie, pois apresentam atividades biológicas como antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, além de cicatrizantes, anticarcinogênica e antimutagênica (Simões et al., 1999; Vital et al., 2004; Monteiro et al., 2005).

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia do método de esterilização por autoclave e microondas e a influência da concentração de álcool na carga microbiana e no teor dos marcadores químicos (taninos e polifenóis totais) de *Schinus terebinthifolius* Raddi.





## Materiais e Métodos

### Amostras

Cascas secas de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram coletadas no município de Guarabira na região da Mata Atlântica do Estado da Paraíba. A espécie foi identificada e registrada no Herbário Parque das Dunas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob o número 20.

### Tratamento da droga vegetal e preparação dos pós das cascas de *S. terebinthifolius*

As cascas foram previamente secas em estufa de ar circulante a 45°C, durante cinco dias e pulverizadas em moinho de facas. A droga vegetal foi dividida em 3 partes, sendo duas delas tratadas e esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 minutos e microondas na potência de 540 W por dois minutos, a outra parte não sofreu tratamento.

### Preparação dos extratos hidroalcoólicos das cascas pulverizadas de *S. terebinthifolius*

Em seguida foram preparados extratos com a droga pulverizada. Os macerados foram preparados numa proporção droga/solução alcoólica de 1:10 (m/v) a temperatura ambiente. O material vegetal ficou em maceração por cinco dias com agitação esporádica. Foram preparados os extratos hidroalcoólicos em concentrações de etanol decrescentes a 70%, 60%, 50% e 40% (v/v).

## Análise Microbiológica

### Preparo dos Meios de Cultura e de Soluções

Os meios de cultura Sabouraud-dextrose para fungos e meio caseína-soja para bactérias foram pesados conforme as quantidades especificadas em cada rótulo, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Em seguida foram distribuídos em placas de Petri em ambiente asséptico. Após resfriamento, foi realizado o teste de esterilização dos meios distribuídos em estufa por um período de 24 horas. Todas as placas foram acondicionadas com papel de filme e guardadas em geladeira.

### Contagem Microbiana

Foi realizado o método direto em placas e todas as análises foram realizadas em triplicata para cada

amostra. O método consiste na contagem da população de microrganismos que apresentam crescimento visível em quatro dias em Agar caseína-soja incubadas a uma temperatura de 30-35°C, e sete dias em meio Sabouraud-dextrose incubados a uma temperatura de 20-25°C. Transferiu-se 10 g ou 10 mL da amostra para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de tampão fosfato pH 7,2. Em seguida, foi realizada agitação até dissolução e ajustou-se o pH entre 6,5-7,5 com ácido clorídrico 0,1 M. Transferiu-se 1 mL desta diluição para 9 mL de água. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas para quatro placas de Petri, logo em seguida foram adicionados os meios de cultura, sendo duas placas com o meio Sabouraud dextrose e duas placas com o meio caseína-soja, ambos liquefeitos a 45°C. O meio foi homogeneizado e deixou-se solidificar. Os meios foram incubados e contaram-se as colônias, calculando-se por fim o número de microrganismos.

Como os pós foram submetidos a processos com elevada temperatura e umidade em autoclave, foi realizado o doseamento dos marcadores – polifenóis e taninos totais - em amostras dos extratos a fim de averiguar se ocorreram diminuições no teor dessas substâncias.

Em trabalho anterior sobre o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento de taninos e polifenóis totais em extratos de Aroeira (Vasconcelos 2003), observou-se que, em função do tempo, temperatura e valor de pH, ocorre hidrólise dos taninos hidrolisáveis levando à formação do seu monômero, o ácido gálico. Assim, os autores decidiram se certificar da possível influência dos processos empregados sobre o teor dos marcadores.

### Determinação Quantitativa de Polifenóis Totais e Taninos Totais por Espectrofotometria Através da Leitura Direta (Vasconcelos, 2003)

Foram transferidos 10,0 mL do extrato para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume completado com água destilada. Uma alíquota de 3,0 mL desta solução foi diluída em 100,0 mL com água destilada. A absorvância foi determinada em 263nm, utilizando água como branco. Para determinação da fração não-tanante (FTN), 10,0 mL da solução foi submetida à agitação em agitador magnético, com 150 mg de caseína





(agente complexante) durante uma hora, em seguida, a solução foi filtrada. Depois, foi retirada uma alíquota de 5,0 mL e diluída com 25 mL de água destilada. A absorvância foi determinada em 263 nm, utilizando água como branco. Os resultados foram calculados segundo as equações abaixo e expressos em (g%) de ácido gálico, através da média de três determinações. (Vasconcelos, 2003)

$$PTF = A_1 \times FD / (m - p) \times A_1^{1\%}$$

$$FNT = A_2 \times FD / (m - p) \times A_1^{1\%}$$

$$TT = PFT - FNT$$

Onde:

PFT = Polifenóis Totais.

FNT = Fração não-tanante (g%).

TT = Taninos Totais (g%).

$A_1$  = Absorvância de polifenóis totais.

$A_2$  = Absorvância da fração não-tanante.

FD = Fator de diluição.

m = massa de matéria-prima vegetal (g).

p = perda por dessecação de matéria-prima (g).

$A_1^{1\%}$  = coeficiente de absorção específica do ácido gálico.

## Resultados e Discussão

Na contagem microbiana realizada nos pós submetidos ao processo de esterilização por autoclave, não foram visualizados crescimentos de fungos, mas houve crescimento bacteriano ( $0,12 \times 10^2$  UFC/g). No processo por microondas ocorreu crescimento tanto para bactérias ( $0,50 \times 10^2$  UFC/g) quanto para fungos ( $0,10 \times 10^2$  UFC/g). As cascas pulverizadas de aroeira, quando não tratadas, apresentaram maior crescimento de bactérias ( $3,68 \times 10^2$  UFC/g) e fungos ( $0,26 \times 10^2$  UFC/g). Comparando-se os dois tratamentos foi verificada uma redução da carga microbiana maior no processo de autoclavação em relação às cascas não tratadas.

A tabela 1 apresenta a contagem microbiana em extratos de diferentes concentrações alcoólicas obtidos a partir de cascas autoclavadas e não tratadas. Ao observar a influência do álcool presente nos extratos nas amostras autoclavadas e não tratadas, verificou-se que, de um modo geral, os extratos com tratamento prévio apresentaram menor contaminação microbiana que os obtidos de cascas não tratadas. Além disso, um percentual maior de etanol favoreceu a obtenção de uma carga microbiana menor. Essas diferenças são estatisticamente significativas tanto para bactérias como para fungos, pelo teste de ANOVA.

**Tabela 1 – Contagem microbiana (UFC/mL) nas amostras de extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* com ou sem esterilização em autoclave.**

Extratos	Ágar Sabouraud-dextrose Não Tratado	Ágar Caseína-soja Não Tratado	Ágar Sabouraud-dextrose Tratado	Ágar Caseína-soja Tratado
40%	$0,4 \times 10^2$	$2,38 \times 10^2$	$0,10 \times 10^2$	$0,14 \times 10^2$
50%	$0,16 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	NC	NC
60%	NC	$1,23 \times 10^2$	NC	NC
70%	NC	NC	NC	NC
Controle	NC	NC	NC	NC

NC = Nenhum crescimento

O álcool etílico é um importante desinfetante por possuir características microbicidas direcionadas a bactérias na forma vegetativa e fungos, mas não tem ação contra os esporos. Portanto, caracteriza-se como desinfetante, anti-séptico, sem propriedade esterilizante. Sua atividade é provavelmente pela desnaturação de proteínas e remoção de lipídios da membrana. A atividade germicida máxima ocorre quando é diluído em água, sendo a concentração recomendada 70% (Harinen et al., 2007; Koransky, Allen e Dowell Jr, 1978; Mazzola et al., 2009; Metcalf, Chambers e Pithie, 2004; Santos et al., 2002).

As amostras dos extratos hidroalcoólicos a 50% e 60% de cascas não tratadas apresentaram maior teor de polifenóis e taninos totais do que os extratos a 40% e 70%. Entre as quatro concentrações, o extrato a 70% foi o que apresentou o menor teor (tabela 2).

**Tabela 2 – Determinação do teor de polifenóis totais, taninos e fração não tanante para os extratos hidroalcoólicos das cascas não tratadas em autoclave de *S. terebinthifolius*.**

Concentração dos Extratos	PFT g%	FNT %	TT g%
40%	$8,53 \pm 0,09$ (0,0107%)	$1,44 \pm 0,14$ (0,0998%)	$7,09 \pm 0,13$ (0,0184%)
50%	$10,43 \pm 0,25$ (0,0246%)	$1,08 \pm 0,12$ (0,1137%)	$9,35 \pm 0,31$ (0,0336%)
60%	$10,51 \pm 0,04$ (0,0039%)	$1,44 \pm 0,19$ (0,1371%)	$9,06 \pm 0,23$ (0,0261%)
70%	$7,88 \pm 0,08$ (0,0113%)	$1,28 \pm 0,25$ (0,2007%)	$6,61 \pm 0,34$ (0,0517%)

Síglas: PFT - Polifenóis Totais; FNT - fração não-tanante; TT - Taninos Totais. Valores representam média  $\pm$  desvio-padrão





Em função desses resultados, apenas os extratos a 50% e 60% foram analisados quanto à eventual influência da autoclavação e microondas sobre o Teor de Taninos e Polifenóis Totais (Tabela 3).

O teor de polifenóis e taninos totais dos extratos hidroalcoólicos das cascas de *S. terebinthifolius* tratadas previamente por autoclave a 121°C por 15 minutos não foi alterado pela influência desse processo de esterilização em relação as cascas não tratadas. (Tabela 3).

O método ANOVA aplicado aos dados dos taninos totais dos extratos hidroalcoólicos mostrou que as diferenças não foram estatisticamente significativas, já que o valor de F (0,300352) foi menor do que o valor de F-crítico (3,098393).

O teor de polifenóis e taninos totais foi superior nas amostras dos extratos de cascas previamente submetidas a tratamento por autoclave (tabela 3), quando comparado com os extratos de cascas não tratadas (tabela 2).

**Tabela 3 – Determinação do teor de polifenóis totais, taninos totais e fração não tanante para extratos hidroalcoólicos das cascas tratadas em autoclave de *S. terebinthifolius*.**

Tratamento / Concentração dos Extratos	PFT g%	FNT %	TT g%
<b>Autoclave 50%</b>	11,17 ± 0,11 (0,011%)	1,57 ± 0,04 (0,0307%)	9,60 ± 0,17 (0,058178%)
<b>Autoclave 60%</b>	11,56 ± 0,26 (0,0228%)	1,66 ± 0,12 (0,0779%)	9,90 ± 0,36 (0,036%)
<b>Microondas 50%</b>	11,08 ± 0,07 (0,0068%)	1,41 ± 0,04 (0,0316%)	9,68 ± 0,11 (0,0123%)
<b>Microondas 60%</b>	11,21 ± 0,38 (0,0346%)	1,34 ± 0,15 (0,1184%)	9,87 ± 0,40 (0,0405%)

Síglas: PFT - Polifenóis Totais; FNT - fração não-tanante; TT-Taninos Totais. Valores representam média ± desvio-padrão

Através do método ANOVA, os resultados obtidos quanto à presença de polifenóis e taninos totais dos extratos hidroalcoólicos das cascas submetidas a tratamento por autoclave, microondas e sem tratamento, mostraram que as diferenças não foram estatisticamente significativas. Esse resultado também foi encontrado quando compararam-se os extratos com

tratamento e sem tratamento, sugerindo que os processos de autoclavação e microondas não alteraram o teor dos marcadores desta planta.

## Conclusão

Os extratos das cascas pulverizadas submetidas previamente ao processo de esterilização por autoclave não apresentaram redução de polifenóis e taninos totais. Estudos futuros avaliarão se outros métodos de esterilização podem ser utilizados para plantas medicinais.

## Referências

Brasil 1999 - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece parâmetros para controle microbiológico de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Diário Oficial da União, Brasília, 1999.

Brasil 2004 - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Regulamento Técnico "Lista de Substâncias que Não Podem Ser Utilizadas em Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes". Diário Oficial da União, Brasília, 2004.

Calixto, J.B. 2001 - Medicamentos fitoterápicos. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. (orgs.) *Plantas medicinais*. p. 297-316. Editora Argos, Santa Catarina.

Dall'Ágnol, L. e Nascimento, T.S.R.S. 1998 - *Avaliação da qualidade microbiológica de plantas medicinais*. Programa e Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p.199. Águas de Lindóia.

Farmacopéia Européia. 2002 - Dosage forms. 4ª edição. p. 560. Edqm, Strasbourg.

Harinen, M.; Khatri, M.; Rayment, E.; Sithamparanathan, L. 2007 - Ethanol Washer Sterilization System. University of Guelph, Proceedings of the ENGG 3100: Design III projects.

Koransky, J.R.; Allen, S. D. e Dowell Jr, V.R. 1978 - Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 762-765.

Mazzola, P.G.; Jozala, A.F.; Novaes, L.C.L.; Moriel, P. e Penna, T. C.V. 2009 - Minimal inhibitory concentration







(MIC) determination of disinfectant and or sterilizing agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 2, p. 241-248.

Metcalfe, S.C.L.; Chambers, S.T. e Pithie, A.D. 2004 - Use of ethanol locks to prevent recurrent central line sepsis. *Journal of Infection*. v. 49, n. 1, p. 20-22.

Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.; Araújo, E.L. e Amorim, E.L.C. 2005 - Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892-896.

Ohara, M.T. e Saito, T. 1984a - Medicamentos não estéreis I. Contaminação microbiana em soluções para uso oral. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 20, n. 1, p. 17-27.

Ohara, M.T. e Saito, T. 1984b - Medicamentos não estéreis. Características intrínsecas e contaminação microbiana em soluções para uso oral. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 20, n. 2, p. 158-168.

Ohara, M.T.; Fischer, D.C. e Saito, T. 1991 - Contaminação microbiana em condicionadores de cabelo. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 27, n. 1, p. 28-36.

Santos, A.A.M.; Verotti, M.P.; Sanmartin, J.A. e Mesiano, E.R.A.B. 2002 - Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. *Revista de Administração em Saúde*, v. 4, n. 16, p. 7-14.

Simões, C.M.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello J.C.P.; Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. 1999 - *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS, Porto Alegre/Florianópolis.

Vasconcelos, E.A.F. 2003 - *Caracterização de extrato seco por aspersão da Schinus terebinthifolius Raddi e validação de metodologia analítica para doseamento de taninos totais*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Vital, B.R.; Carneiro, A.C.O.; Pimenta, A.S. e Della Lucia, R.M. 2004 - Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. *Revista Árvore*, v. 28, n. 4, p. 571-582.

World Health Organization (WHO). 1998 - Quality control methods for medicinal plant materials. WHO/PHARM/92.559, 1998.

**Recebido em Agosto de 2011. Aceito em Janeiro de 2012**

