

# COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AZEITONAS DESCAROÇADAS “ALCAPARRA” PRODUZIDAS EM TRÁS-OS-MONTES

Sousa, A.<sup>1</sup>; Ferreira, I.C.F.R.<sup>1</sup>, Calhelha, R.<sup>1</sup>; Andrade, B.A.<sup>2</sup>; Valentão, P.<sup>2</sup>; Estevinho, L.<sup>1</sup>; Bento, A.<sup>1</sup>; Seabra, R.M.<sup>2</sup>; Pereira, J.A..<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal. jpereira@ipb.pt

<sup>2</sup> REQUIMTE/Serviço de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal.

**Palavras-chave:** “alcaparras”, composição fenólica, actividade antimicrobiana.

Resumo: Em Trás-os-Montes, no início do Outono, são produzidas azeitonas descaroçadas em pedaços, conhecidas como “alcaparras”, muito apreciadas e consumidas na região principalmente nos períodos de Outono-Inverno. Com a realização do presente trabalho, pretendeu-se por um lado proceder à caracterização da fracção fenólica deste tipo de azeitona de mesa por HPLC/DAD, e por outro proceder à avaliação *in vitro* de extractos aquosos de “alcaparra” contra diferentes microrganismos patogéneos agentes de infecções intestinais e respiratórias, nomeadamente bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungos (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*). Foram identificados e quantificados três compostos flavonóides: luteolina 7-O-glucosido, apigenina 7-O-glucosido e luteolina. Verificou-se, a baixas concentrações de extracto de “alcaparra” (0,05 mg/mL), uma inibição significativa do crescimento das bactérias, com excepção de *P. aeruginosa*. Os extractos estudados mostraram, nas concentrações testadas, não possuir actividade antifúngica.

## 1. INTRODUÇÃO

A azeitona de mesa é um alimento tradicionalmente incluído na dieta Mediterrânica, sendo considerada uma fonte importante de antioxidantes naturais, nomeadamente compostos fenólicos e vitamina E. A presença destes compostos nos alimentos tem sido relacionada com uma menor taxa de incidência de doenças coronárias nos países da Bacia do Mediterrâneo.

Por azeitona de mesa, entende-se o produto preparado a partir de frutos de variedades apropriadas da espécie *Olea europaea sativa* Hoffg Link, em estado de maturação conveniente, submetidos a tratamentos e operações que assegurem as suas características de boa conservação [1]. Existem diferentes tipos de azeitona de mesa dependendo sobretudo do grau de maturação dos frutos utilizados na sua preparação, do processo de preparação e/ou da sua forma de apresentação.

Em Trás-os-Montes, há um grande consumo dos diferentes tipos de azeitona de mesa, sendo as azeitonas descaroçadas tipo “Alcaparra”, produto obtido de forma tradicional, largamente consumidas nos meses de Outono-Inverno. As “alcaparras” são processadas de frutos verdes e verde amarelados, que são quebrados com a ajuda de um martelo de madeira sendo a polpa separada do caroço. A polpa fica separada em aproximadamente duas partes iguais perpendiculares ao eixo máximo do fruto. Os frutos são posteriormente colocados em água que é trocada diariamente ou cada dois dias durante uma semana. Este tratamento remove o

amargor das azeitonas sendo as azeitonas temperadas com sal, ervas aromáticas e casca de laranja antes de serem consumidas [2].

Os compostos fenólicos e seus glucosídeos representam 1 a 3% do peso da azeitona, sendo os álcoois fenólicos, flavonoides e secoiridoides as classes mais importantes presentes em azeitona de mesa os ácidos fenólicos [3-5]. A fracção fenólica é muito complexa e pode variar tanto em quantidade como qualidade dependendo do método de processamento [6], da cultivar [7], das condições climáticas [8], do regime hídrico [9] e do grau de maturação do fruto [10].

Alguns trabalhos têm demonstrado propriedades antimicrobianas de extractos de produtos da oliveira como as folhas [11], o fruto [6] e de compostos isolados deles como a oleuropeína, hidroxitirosol [12] e álcoois alifáticos [13] sobre o crescimento de diferentes microrganismos.

Com a realização do presente trabalho, pretendeu-se por um lado proceder à caracterização da fracção fenólica deste tipo de azeitona de mesa por HPLC/DAD, e por outro proceder à avaliação *in vitro* de extractos aquosos de “alcaparra” contra diferentes microrganismos patogéneos agentes de infecções intestinais e respiratórias, nomeadamente bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungos (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras de “alcaparras”

As amostras foram obtidas num supermercado local e congeladas. Posteriormente, foram liofilizadas, trituradas e armazenadas num exsiccador protegidas da luz.

### 2.2. Identificação e quantificação de compostos fenólicos

A extracção foi efectuada de acordo com o descrito por Vinhas *et al.* [14].

A análise foi efectuada por HPLC-DAD nas condições referidas por Vinhas *et al.* [14]. A quantificação dos compostos fenólicos foi efectuada por comparação da absorvância a 350 nm registada nos cromatogramas em relação a padrões externos.

### 2.3. Actividade antimicrobiana

Os extractos foram obtidos usando água em ebulição durante 45 min sendo, posteriormente, congelados, liofilizados e redissolvidos em água (50 mg/mL).

Bactérias testadas: *B. cereus* CECT 148, *B. subtilis* CECT 498, *S. aureus* ESA 7, *E. coli* CECT 101, *P. aeruginosa* CECT 108 e *K. pneumoniae* ESA 8. Fungos testados: *C. albicans* CECT 1394 e *C. neoformans* ESA 3. Os microrganismos CECT foram adquiridos da Colecção Espanhola de Culturas da Universidade de Valência, enquanto que os microrganismos ESA são isolados clínicos identificados no laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança.

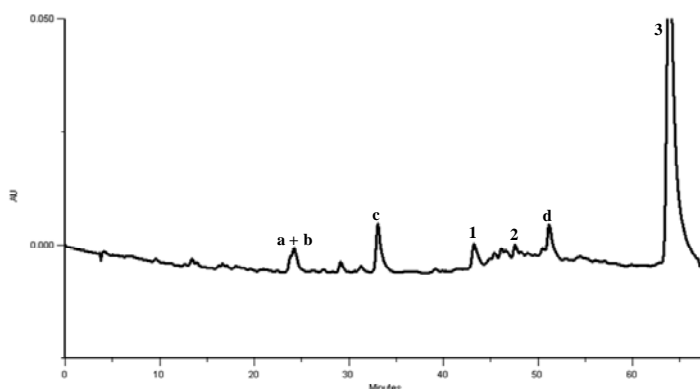
Foi efectuada um *screening* de actividades antimicrobianas contra bactérias Gram - (*E. coli*, *P. aeruginosa*, e *K. pneumoniae*), bactérias Gram + (*B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus*) e leveduras (*C. albicans*, *C. neoformans*), tendo sido determinadas as concentrações mínimas inibitórias de crescimento (MICs em mg/mL) e os halos de inibição pelo método de difusão radial em agar [15]. A ampicilina (antibacteriano) e a cicloheximida (antifúngico) foram usadas como padrões.

As bactérias mais susceptíveis (*B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) foram, posteriormente, utilizadas em ensaios de actividade antimicrobiana em meio líquido de

acordo com o descrito pelo nosso grupo [2]. Os valores da velocidade de crescimento bacteriano foram obtidos por regressão linear na fase de crescimento exponencial, nos gráficos de densidade óptica a 540 nm *versus* tempo de incubação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados, nas amostras de “alcaparras”, três compostos fenólicos: luteolina 7-*O*-glucosido (1), apigenina 7-*O*-glucoside (2) e luteolina (3) (Fig. 1).



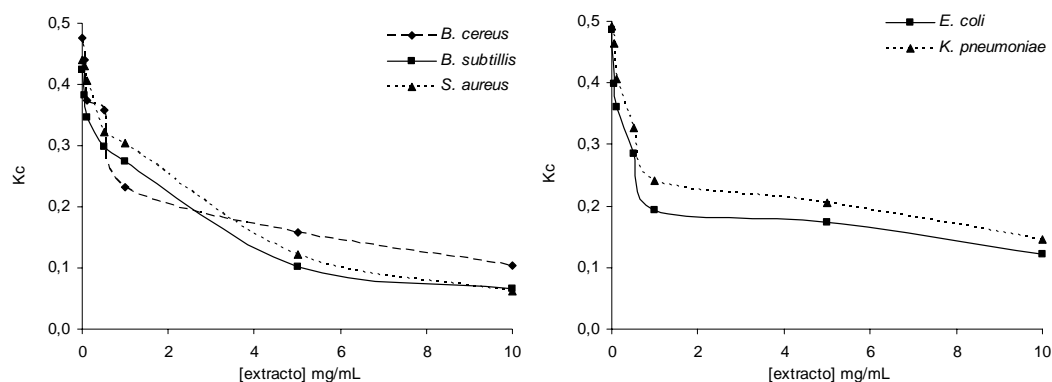
**Figura 1.** Perfil fenólico da amostra de “alcaparras”.

O extracto de “alcaparras” inibiu todas as bactérias testadas, com excepção da bactéria Gram-, *P. aeruginosa*. *B. cereus* e *K. pneumoniae* foram as bactérias Gram+ e Gram- mais susceptíveis, respectivamente (Tabela 1). As leveduras testadas, *C. albicans* e *C. neoformans*, foram resistentes ao extracto de “alcaparras”.

**Tabela 1.** Actividade antimicrobiana do extracto de “alcaparras”.

Samples	MIC (mg/mL)							
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
Alcaparra	25 (9.5) (++++)	25 (5) (++)	25 (5.0) (++)	50 (-)	50 (9) (+++)	10 (3.625) (++)	50 (-)	50 (-)
Ampicillin	0.00313 (++++)	0.0125 (++++)	0.00625 (++++)	0.00625 (++++)	0.00625 (++++)	0.00625 (++++)	NT	NT
Cycloheximide	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.0125 (++)	0.00625 (++++)

Os microrganismos que demonstraram susceptibilidade nos ensaios em meio sólido foram submetidos a novos ensaios em meio líquido, de forma a comparar os efeitos na velocidade de crescimento. Os valores obtidos sugerem uma actividade antibacteriana de largo espectro e dependente da concentração de extracto. De acordo com o perfil de crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações de extracto (Fig. 2), as “alcaparras” revelaram actividade antimicrobiana contra *E. coli* > *K. pneumoniae* > *B. cereus* > *B. subtilis* > *S. aureus*.



**Figura 2.** Taxa de crescimento bacteriano (Kc) na presença de diferentes concentrações de extracto de “alcaparras”.

alcaparra” são uma boa fonte de agentes antimicrobianos contra bactérias responsáveis por infecções do tracto intestinal e respiratório. Os resultados obtidos são particularmente importantes no caso de *S. aureus*, microrganismo produtor de enterotoxinas, e de *E. coli*, ambos excepcionalmente resistentes a vários fitoquímicos. Assim, o consumo de “alcaparras” pode reduzir o risco de infecções bacterianas, devido à acção protectora dos compostos fenólicos presentes neste alimento.

### Agradecimentos

Programa INTERREG III A, Projecto MOABEPE “Identificación de los agentes patógenos y beneficiosos de los principales cultivos de las regiones fronterizas Trás-os-Montes y Castilla y León para la realización de estrategias de control razonadas”.

### Referências

- [1] – Norma Portuguesa (NP) 3034, 1987.
- [2] – Sousa, A.; Ferreira, I.C.R.; Calhelha, R.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J.A. – *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 8533-8538.
- [3] –Owen, R. W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. - *Food Chem. Toxicol.* **41** (2003) 703-717.
- [4] –Vinha, A. F.; Ferreres, F.; Silva, B.M.; Valentão, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J. A.; Oliveira, M.B.P.P.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B. - *Food Chem.* **89** (2005) 561-568.
- [5] – Pereira, J. A.; Pereira, A.P.; Ferreira, I.C.F.R.; Valentão, P.; Andrade, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A. – *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 8425-8431.
- [6] –Romero, C., Brenes, M.; Yousfi, K.; Garcia, P.; Garcia, A.; Garrido, A. - *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 479-484.
- [7] – Esti, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. - *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 32-35.
- [8] – Salvador, M.D., Aranda, F., & Fregapane, G. - *Food Chem.* **73** (2001) 45–53.
- [9] – Romero, M. P.; Tovar, M. J.; Girona, J.; Motilva, M. J. - *J. Agric. Food Chem.* **50**, (2002) 5349-5354.
- [10] – Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., & Albi, M.A. - *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 121–127.
- [11] – Markin, D.; Duek, L.; Berdicevsky, I. - *Mycoses* **46** (2003), 132-136
- [12] – Bisignano, G.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccelle, N.; Saija, A. - *J. Pharm. Pharmacol.* **51** (1999) 971-974.
- [13] – Battinelli, L.; Daniele, C.; Cristiani, M.; Bisignano, G.; Saija, A.; Mazzanti, G. - *Phytomedicine* **11** (2006) 558-563.
- [14] - Vinhas, A. F.; Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A.; Oliveira, M. B. P. P. J. *Liq. Chrom. Relat. Tech.* **25** (2002) 151–160.
- [15] - Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R. C.; Estevinho, L. M.; Queiroz, M-J. R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** (2004) 5831–5833.