

ESTUDO PRELIMINAR DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *CYDONIA OBLONGA* MILLER

Catarina Filipe

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública
Escola Superior de Saúde - UFP
catarinafilipe1@hotmail.com

Ricardo Silva

Técnico de Laboratório
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
ricardos@ufp.pt

Ana Miranda

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública
Escola Superior de Saúde - UFP
tarina18@hotmail.com

Andreia P. Oliveira

Aluna da Licenciatura em Ciências Farmacêuticas
Faculdade Ciências da Saúde - UFP
12380@ufp.pt

Branca M. Silva

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade Ciências da Saúde - UFP
REQUIMTE - UP
bsilva@ufp.pt

João Carlos Sousa

Professor Catedrático
CEBIMED, Faculdade Ciências da Saúde - UFP
jcsousa@ufp.pt

Fátima Cerqueira

Professora Auxiliar
CEBIMED Faculdade Ciências da Saúde - UFP
CEQUIMED - UP
fatimaf@ufp.pt

RESUMO

O marmelo é reconhecido como uma importante fonte de compostos promotores da saúde sendo que a actividade antimicrobiana dos extractos da sua polpa, casca e sementes foi já avaliada. Não existem porém estudos da actividade antimicrobiana das folhas de marmeleiro. Este estudo preliminar teve como objectivo determinar a actividade dos seus extractos metanólicos. Concluiu-se que os extractos testados não apresentam actividade em *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Mucor spp* e *Absidia spp* pelo que novos extractos devem ser preparados sendo posteriormente avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos; Bactérias; Leveduras; Fungos filamentosos; Extractos metanólicos; compostos fenólicos; *Cydonia oblonga* Miller.

ABSTRACT

Quince fruit is recognized an important source of health promoting compounds being the antimicrobial activities of the quince pulp, peel grape and seed extracts already evaluated.

No results are known for quince leaves antimicrobial activity. This preliminary work intended to determine the activity of quince leaves methanolic extracts. These had no antimicrobial activity either against *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Mucor spp* e *Absidia spp* and new extracts must be prepared and evaluated.

KEY-WORDS: Antimicrobial agents; Bacteria; Yeasts; Filamentous fungi; Methanolic extracts; Phenolic compounds; *Cydonia oblonga* Miller.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de antifúngicos seguros e eficazes tem vindo a aumentar lado a lado com o aumento de pacientes imunodeprimidos em risco de contrair infecções sistémicas (Ferreira e Sousa, 2000). A emergência de fungos patogénicos resistentes às terapias actualmente disponíveis, bem como os efeitos adversos e o reduzido espectro de acção dos antifúngicos existentes no mercado, tornam necessária e urgente a pesquisa de novos compostos para o tratamento de micoses invasivas, provocadas em grande número por leveduras (especialmente do género *Candida spp.*) e fungos filamentosos (nomeadamente *Aspergillus spp.* e zigomicetes) (Brooks *et al.*, 2005; Hirasawa e Takada, 2004; Pinto *et al.*, 2006; Yang *et al.* 2006).

As plantas constituem desde sempre uma boa fonte de compostos bioactivos, sendo que os compostos fenólicos estão entre os mais activos e com maior espectro de acção na inibição de microrganismos (Gigante *et al.* 2003; Pinto *et al.*, 2006; Yang *et al.* 2006). Os mecanismos descritos como responsáveis pelos efeitos tóxicos dos polifenóis sobre os microrganismos incluem a adsorção e a ruptura das membranas celulares microbianas e a interacção com enzimas, substratos e metais (Fattouch *et al.*, 2007).

O marmelo (*Cydonia oblonga* Miller) é consumido em grande quantidade no nosso País, sobretudo na forma de marmelada e de geleia, produtos tradicionais Portugueses. Na última década, a composição química deste fruto tem sido bastante estudada, tendo-se verificado que se trata de uma excelente fonte de compostos fenólicos e de ácidos orgânicos, compostos com reconhecida actividade antioxidante (Silva *et al.*, 2004 e 2008; Oliveira e Silva, 2007). Diversos autores têm relacionado o perfil fenólico deste fruto não só com as suas propriedades antioxidantes, mas também com as suas propriedades antimicrobiana (antibacteriana e antiviral) e anti-ulcerativa (García-Alonso *et al.*, 2004; Fattouch *et al.*, 2007; Hamazu *et al.*, 2005 e 2006; Silva *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Yildirim, 2006).

A medicina popular tem recorrido aos frutos e às folhas de *C. oblonga* devido aos seus efeitos benéficos no tratamento de doenças cardiovasculares e de pele, hemorróidas, asma e tosse. Também já foram relatadas as propriedades tranquilizantes, antipiréticas e antidiarreicas das folhas, bem como a sua actividade antioxidante (Oliveira *et al.*, 2007 e 2008; Yildirim *et al.*, 2001).

Em estudos recentes (Oliveira *et al.*, 2007 e 2008), efectuados no CEBIMED da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, realizou-se a determinação dos perfis em compostos fenólicos e em ácidos orgânicos das folhas de marmeleiro, tendo-se verificado que se trata de uma excelente fonte de compostos bioactivos. No entanto, até ao momento, não existem estudos da actividade antimicrobiana destas folhas que, devido ao seu elevado conteúdo em compostos fenólicos, se mostram excelentes candidatas para este tipo de actividade (Oliveira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

A água foi tratada num sistema de purificação (Millipore, Bedford, MA). O Agar Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar) é da BBL, o Agar nutritivo (Caldo Nutritivo) da Merck, o Agar Agar da Fluka e o Agar Mueller Hinton 2 (MH2; Gelose Mueller Hinton 2) da Biomerieux. O metanol foi adquirido na Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os restantes reagentes foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO).

2.2. AMOSTRAS

As amostras de folhas de marmeleiro (Tabela 1) foram colhidas em três zonas diferentes do Norte e Centro de Portugal (Bragança, Carrazeda de Ansiães e Covilhã), em meados de Junho de 2006. Todas as amostras foram secas numa estufa (Memmert UL6D) a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 5 dias (no escuro).

Tabela 1. Caracterização das amostras de folhas de marmeleiro.

Amostra	Origem geográfica
1	Bragança – Pinheiro Manso
2	Bragança – Quinta
3	Bragança – Tecnologia
4	Bragança – Vale de Álvaro
5	Carrazeda de Ansiães – Barrancas
6	Carrazeda de Ansiães – Botelho
7	Carrazeda de Ansiães – Cortinha
8	Carrazeda de Ansiães – Gorgulão
9	Covilhã – Mina
10	Covilhã – Peso
11	Covilhã – Quinta Ortigal
12	Covilhã – Silveira

Foram utilizadas amostras representativas de cada uma das regiões (Bragança, Carrazeda de Ansiães e Covilhã) para posterior determinação da actividade antimicrobiana.

2.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS

Pesaram-se 0,1 g de cada uma das amostras representativas previamente moídas e realizou-se uma extracção com 3×10 ml de metanol (40°C a 300 rpm) durante 10 minutos. O extracto metanólico (30 ml) foi posteriormente levado à secura total em rotavapor (Buchi R210, Rotoquímica; heating bath B491; Bomba Vácuo KNFNeuberger N035AN18) com aquecimento (35°C). Os extractos foram redissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO; 20 mg/ml) e conservados a -20°C . No momento da realização do ensaio, foram diluídos em água destilada estéril.

2.4. ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA

Prepararam-se suspensões das bactérias (1×10^8 CFU/ml) em água destilada estéril, a partir de culturas em agar nutritivo com 24 h de crescimento, tendo sido inoculados 50 μl de suspensão da bactéria/10 ml agar MH 2. Em placas de 96 poços de fundo plano (Costar) foram colocados 5 μl de cada uma das diluições sucessivas (1:2) dos compostos em DMSO. Para a Gentamicina foram realizadas diluições seriadas 1:2 em água, a partir de uma solução inicial com 10 mg/ml em água destilada estéril. Posteriormente adicionaram-se 100 μl do meio de cultura inoculado a cada um dos poços. O efeito no crescimento das bactérias foi registado após 24 h de incubação a 37°C .

2.5. ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA

Prepararam-se suspensões dos fungos (1×10^6 CFU/ml para leveduras e 2×10^5 CFU/ml para fungos filamentosos) em água destilada estéril, a partir de culturas em agar Sabouraud. Para as leveduras foram utilizadas culturas com 24 h de incubação. Após preparação da suspensão dos fungos (100 μ l de suspensão do fungo/10 ml agar Sabouraud) adicionaram-se 250 μ l a 5 μ l de cada uma das diluições sucessivas (1:2) dos compostos em DMSO, em placas de 96 poços de fundo plano (Costar). Para a Anfotericina B foram realizadas diluições seriadas 1:2 em água, a partir de uma solução inicial com 20 μ g/ml em água destilada estéril. O efeito no crescimento das leveduras foi registado após 24 h de incubação a 37°C enquanto que no caso dos fungos filamentosos (*A. niger*, *A. fumigatus*, *Mucor sp.*, *Absidia sp.*) os registos efectuaram-se do 2º ao 7º dia de incubação, a 25°C.

2.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

Para cada experiência foram introduzidos o controlo positivo (meio de cultura inoculado), controlo negativo (meio de cultura), brancos do extracto (meio de cultura com composto) e controlo do DMSO (DMSO com meio de cultura inoculado).

Não se verificou nenhuma interferência do DMSO no crescimento dos diferentes microorganismos para as concentrações utilizadas.

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) corresponde à mínima concentração testada capaz de inibir totalmente o crescimento do microorganismo em estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extractos testados, representativos de três regiões geográficas do Norte e Centro de Portugal, mostraram não possuir nenhum efeito inibidor no crescimento de bactérias (*S. aureus* e *E. coli*), leveduras (*C. albicans* e *C. glabrata*) ou fungos filamentosos (*A. niger*, *A. fumigatus*, *Mucor sp.* e *Absidia sp.*), mesmo quando testados na concentração máxima de 1mg/ml (bactérias) ou 0.8mg/ml (fungos). Não foram testadas concentrações superiores dado que as utilizadas já se consideram demasiado elevadas para extractos (Gigante *et al.*, 2003).

As concentrações mínimas inibitórias para os controlos positivos testados são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações mínimas inibitórias (CMI) da Gentamicina e Anfotericina B.

Antimicrobiano	Microorganismo	CMI (μ g/mL; n=3)
Gentamicina	<i>S. aureus</i>	2,08
	<i>E. coli</i>	4,16
Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	0,63
	<i>C. glabrata</i>	1,25
	<i>A. niger</i>	5,00
	<i>A. fumigatus</i>	10,00
	<i>Mucor spp</i>	5,00
	<i>Absidia spp</i>	5,00

Apesar deste estudo preliminar ter demonstrado que os extractos metanólicos de folha de marmeleiro não possuem propriedades antimicrobianas, o perfil fenólico das folhas de marmeleiro justifica que outros extractos devam ser preparados, recorrendo a solventes (ou misturas de solventes) com diferentes polaridades, de forma a extrair outros compostos ou os mesmos mas noutras proporções. Vários estudos sugerem que os compostos fenólicos, especialmente os derivados do ácido cinâmico, são os principais responsáveis pelas suas actividades biológicas e consequentemente pelo seu efeito benéfico na saúde.

Recentemente o nosso grupo determinou o perfil fenólico de doze amostras de folhas de *Cydonia oblonga* Miller colhidas em três zonas distintas de Portugal Continental, no mês de Junho. O perfil fenólico da folha de *C. oblonga* é constituído por nove compostos (Figura 1): os ácidos 3-*O*-, 4-*O*- e 5-*O*-cafeoilquínicos e 3,5-*O*-dicafeoilquínico, a 3-*O*-galactosilquercetina, a rutina (3-*O*-rutinosilquercetina), um glicósido do campferol, o 3-*O*-glucosilcampferol e o 3-*O*-rutinosilcampferol. O conteúdo fenólico total é elevado, tendo oscilado entre 6,6 e 16,5 g/kg de matéria seca (Tabela 3). Em termos quantitativos, verificou-se uma maior abundância do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (31-41%) e da rutina (13-28%).

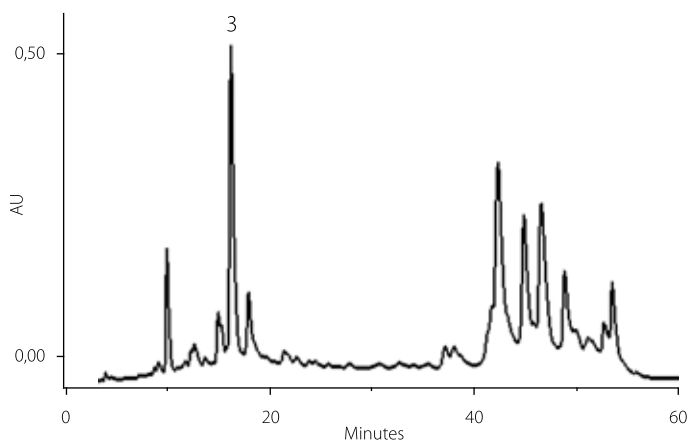


Figura 1. Perfil cromatográfico representativo da folha de marmeleiro (adaptado de Oliveira *et al.*, 2007). Detecção a 350 nm. (1) ácido 3-*O*-cafeoilquínico, (2) ácido 4-*O*-cafeoilquínico, (3) ácido 5-*O*-cafeoilquínico, (4) ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, (5) 3-*O*-galactosilquercetina, (6) rutina, (7) glicósido do campferol, (8) 3-*O*-glucosilcampferol e (9) 3-*O*-rutinosilcampferol.

Tabela 3. Perfil fenólico quantitativo das amostras de folhas de marmeleiro^a (adaptado de Oliveira *et al.*, 2007)

Composto fenólico (%)										
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Σ (g/kg)
1	9,97 ± 0,01	0,18 ± 0,02	33,60 ± 0,08	6,14 ± 0,06	3,48 ± 0,05	21,43 ± 0,11	8,82 ± 0,16	2,02 ± 0,02	14,36 ± 0,15	10,92
2	10,05 ± 0,10	0,39 ± 0,01	36,95 ± 0,32	3,18 ± 0,03	1,99 ± 0,01	23,31 ± 0,16	8,80 ± 0,01	1,45 ± 0,01	13,87 ± 0,05	9,06
3	7,86 ± 0,05	0,17 ± 0,01	33,44 ± 0,33	3,50 ± 0,01	5,54 ± 0,33	25,91 ± 0,40	8,88 ± 0,47	1,60 ± 0,10	13,09 ± 0,57	11,61
4	14,63 ± 0,13	0,70 ± 0,01	30,76 ± 0,17	3,69 ± 0,10	1,60 ± 0,02	28,39 ± 0,43	8,22 ± 0,10	0,99 ± 0,01	11,01 ± 0,17	6,61
5	17,93 ± 0,12	1,89 ± 0,02	40,32 ± 0,20	5,70 ± 0,30	1,86 ± 0,01	15,95 ± 0,03	5,81 ± 0,06	1,95 ± 0,10	8,59 ± 0,04	10,44
6	10,45 ± 0,22	0,46 ± 0,01	39,20 ± 2,06	5,99 ± 0,01	4,65 ± 0,14	20,67 ± 1,13	7,01 ± 0,14	1,96 ± 0,08	9,61 ± 0,29	16,51
7	17,39 ± 0,15	1,07 ± 0,01	40,14 ± 0,20	8,42 ± 0,06	2,33 ± 0,01	13,18 ± 0,09	6,72 ± 0,03	1,74 ± 0,03	9,02 ± 0,01	14,07
8	15,10 ± 0,02	3,01 ± 0,02	39,76 ± 0,64	5,76 ± 0,29	1,88 ± 0,06	15,33 ± 0,16	7,27 ± 0,14	1,63 ± 0,05	10,25 ± 0,09	14,77
9	14,13 ± 0,13	0,31 ± 0,01	36,95 ± 0,25	4,33 ± 0,08	3,47 ± 0,04	20,61 ± 0,04	8,03 ± 0,01	1,14 ± 0,01	11,02 ± 0,02	9,04
10	9,46 ± 0,05	0,17 ± 0,01	39,22 ± 0,18	4,27 ± 0,03	4,48 ± 0,01	19,10 ± 0,01	8,36 ± 0,01	1,98 ± 0,08	12,97 ± 0,03	11,64
11	11,92 ± 0,23	0,55 ± 0,02	40,91 ± 0,92	4,84 ± 0,06	1,77 ± 0,07	20,36 ± 0,23	6,37 ± 0,04	nd	13,28 ± 0,08	10,98
12	10,54 ± 0,02	0,15 ± 0,02	37,45 ± 0,15	3,63 ± 0,01	3,59 ± 0,03	20,22 ± 0,09	8,65 ± 0,12	1,62 ± 0,07	14,16 ± 0,17	11,71

^a Valores expressos em percentagem (media ± desvio padrão de 3 determinações). Abreviaturas: nd – não detectável;

Σ – soma dos compostos fenólicos determinados; 1 – ácido 3-O-cafeoilquinico; 2 - ácido 4-O-cafeoilquinico;

3 - ácido 5-O-cafeoilquinico; 4 - ácido 3,5-O-dicafeoilquinico; 5 - 3-O-galactosilquercetina; 6 – rutina;

7 - glicósido do campferol; 8 - 3-O-glucosilcampferol; 9 - 3-O-rutinosilcampferol.

Tendo em consideração todos os resultados apresentados, e com base nas actividades biológicas descritas para os compostos fenólicos e as propriedades farmacológicas que têm sido atribuídas a esta espécie de origem vegetal, deverá proceder-se à avaliação da actividade antimicrobiana de novos extractos.

4. BIBLIOGRAFIA

- BROOKS, G.F., Butel, J. e Morse S. (2005) *Microbiologia Médica*. 22 Ed, Brasil, McGraw-Hill.
- FATTOUCH S., Caboni P., Coroneo V., Tuberosos C., Angioni A., Dessi S., Marzouki N. e Cabras P. (2007) Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts. In: *J. Agric. Food Chem.*, 55, 963-969.
- FERREIRA W. e Sousa JC. (2000) *Microbiologia*. Volume 2, Lisboa, LIDEL.
- GARCÍA-ALONSO, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. e Rivas-Gonzalo, J.C. (2004) Evaluation of the antioxidant properties of fruits. In: *Food Chem.*, 84, 13-18.
- GIGANTE B., Santos C., Silva A., Curto M., Nascimento M., Pinto E., Pedro M., Cerqueira F., Pinto M., Duarte M., Laires A., Rueff J., Gonçalves J., Pegado M. e Valdeira M. (2003) Catechols from abietic acid synthesis and evaluation as bioactive compounds In: *Bioorg. Med Chem.*, 11, 8, 1631-1638.
- HAMAUZU, Y., Inno, T., Kume, C., Irie, M. e Hiramatsu, K. (2006) Antioxidant and antiulcerative properties of phenolics from chinese quince, quince, and apple fruits. In: *J. Agric. Food Chem.* 54, 765-772.
- HAMAUZU, Y., Yasui, H., Inno, T., Kume, C. e Omanyuda, M. (2005) Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. In: *J. Agric. Food Chem.*, 53, 928-934.
- HIRASAWA M. e Takada K. (2004) Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*, In: *J. Antimic. Chemother.*, 53, 225-229.
- OLIVEIRA A., Pereira J., Andrade P., Valentão P., Seabra R. e Silva B. (2007) Phenolic Profile of *Cydonia oblonga* Miller Leaves. In: *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7926-7930
- OLIVEIRA, A.P., Pereira, J.A, Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M. e Silva, B.M. (2008) Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. In: *Food Chem.* (in press).
- OLIVEIRA, A.P., Silva, B.M. (2007) Marmelo (*Cydonia oblonga* Miller): fonte de compostos biologicamente activos. In: *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa*, 4, 76-86.
- PINTO, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, MJ., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. e Martinez-de-Oliveira, J. (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. In: *J. Med. Microbiol.*, 55, 1367-1373.
- SILVA, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M. e Andrade, P.B. (2008) Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. In: *Food Chemistry Research Developments* (in press).
- SILVA, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2004) Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. In: *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4405-4712.
- WANG, X., Jia, W., Zhao, A. e Wang, X. (2006) Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. In: *Phytother. Res.*, 20, 335-341.
- YANG CR, Zhang Y, Jacob MR, Khan, SI, Zhang YJ e Li XC. (2006) Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. In: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50. 1710-1714.
- YILDIRIM, H.T. (2006) Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. In: *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 20, 335-341.
- YILDIRIM, H.T., Oktay, M. e Bilaloglu, V. (2001) The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. In: *Turk. J. Med. Sci.*, 31, 23-27.