



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Pimenta dioica* Lindl



João Pessoa – PB – Brasil

Maio/2009



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Pimenta dioica* Lindl**

JOELKSON DINIZ RIBEIRO

Tese apresentada como requisito
para obtenção do título de
Doutor em Química pela
Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
2º Orientador: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

João Pessoa – PB - Brasil

Maio/2009

R484e Ribeiro, Joelkson Diniz.

Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica Lindl* / Joelkson Diniz Ribeiro.- João Pessoa, 2009.

93f. : il.

Orientadores: Victor Elias Mouchrek Filho, Antônio Gouveia de Souza

Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

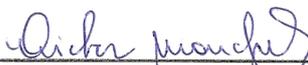
1. Óleo essencial (química analítica). 2. *Pimenta dioica*.
3. Atividade antibacteriana. 4. Eugenol.

UFPB/BC

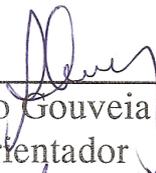
CDU: 543.383(043)

Tese de Doutorado submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
2º. Orientador



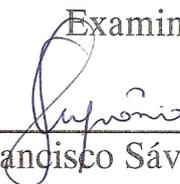
Prof. Dr. Carlos Davidson Pinheiro
Examinador



Profa. Dra. Marta Maria da Conceição
Examinadora



Prof. Dr. José Regis Botelho
Examinador



Prof. Dr. Francisco Sávio Mendes Sinfrônio
Examinador

"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou sem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna."

Baltasar Gracián

Dedico este trabalho

*À minha mãe, Maria Nazira Diniz
Ribeiro, a mulher mais forte que já
conheci, pelo amor, carinho e dedicação
imensuráveis.*

*Ao meu pai, Sebastião dos Santos
Ribeiro, pelo amor e pelas oportunidades
oferecidas.*

*À minha esposa, Márcia Regina, pelo
carinho e apoio na elaboração deste
trabalho, e aos meus filhos: Emily
Gabriela, Silvio Neto e Isabelle
Christinne, por me encherem de alegria nos
momentos difíceis.*

*Aos meus Irmãos: José Luís, Joelmikson,
Joelma, Cielma, Kelma e Nielma, que
sempre me apoiaram e incentivaram.*

*Aos meus avós, José Alexandre
Diniz e Noemia Reis Rodrigues (in
memorian), pelos ensinamentos e
ajuda.*

*Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchreck Filho,
sua esposa Verlange e minha queridíssima
afilhada Verlane, por todo carinho e
felicidades compartilhadas.*

Agradecimentos

A Deus, por todas as conquistas e dificuldades superadas.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, pela orientação deste trabalho, amizade, paciência, compreensão e ensinamentos compartilhados durante vários anos de convívio.

Ao Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza, pela inestimável ajuda na elaboração deste trabalho e pela orientação sempre segura.

À Prof^a. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento, pelos ensinamentos, pela amizade, orientação e colaboração prestada.

Aos colegas de Doutorado, Odair, Rogério, Antonio Araújo e Vera Lúcia, pelo constante incentivo.

Ao Químico Wendell Mesquita, pelo companherismo, apoio e ajuda nas análises eletroquímicas.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão, em especial Josilene e André, pela contribuição nas análises microbiológicas, paciência e, acima de tudo, pela amizade.

*Ao amigo **Glene**, pela ajuda tão gentilmente oferecida na forma de suporte material e humano.*

*Aos meus compadres **João Reis Salgado Costa Sobrinho e Antonio Araújo dos Santos**, pelo grande e total apoio.*

A todos que (direta ou indiretamente) contribuíram para a realização deste trabalho os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	i
	LISTA DE FIGURAS	ii
	LISTA DE TABELAS	v
	RESUMO	vi
	ABSTRACT	vii
	 CAPÍTULO 1	
1.	INTRODUÇÃO	01
	 CAPÍTULO 2	
2.	REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1	Óleos essenciais	03
2.1.1	Processo de extração	04
2.2	<i>Pimenta dioica</i> Lindl	06
2.3	Aspectos gerais sobre voltametria	13
2.3.1	Voltametria cíclica	15
2.3.2	Voltametria de pulso diferencial	16
2.4	Teste da atividade antibacteriana pelo método da difusão em disco	18
2.5	Antibióticos	18
2.6	Considerações sobre as bactérias testadas	19
2.6.1	<i>Escherichia coli</i>	19
2.6.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.6.3	<i>Proteus mirabilis</i>	20
2.6.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.6.5	<i>Serratia odorífera</i>	21
	 CAPÍTULO 3	
3.	OBJETIVOS	22

CAPÍTULO 4

4.	PARTE EXPERIMENTAL	23
4.1	Equipamentos	23
4.1.1	Sistema extrator	23
4.1.2	Refratômetro	24
4.1.3	Moinho elétrico	24
4.1.4	Estufa bacteriológica	24
4.1.5	Peagômetro	25
4.1.6	Balança analítica	25
4.1.7	Análise espectroscópica na região do ultravioleta e visível..	25
4.1.8	Análise espectroscópica na região do infravermelho	25
4.1.9	Análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ¹³ C)	25
4.1.10	Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	26
4.2	Soluções e reagentes	26
4.2.1	Solução tampão	27
4.2.2	Soluções estoque	27
4.3	Metodologia experimental	27
4.3.1	Obtenção do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	28
4.3.1.1	Origem e preparo da amostra	28
4.3.1.2	Moagem dos frutos	28
4.3.1.3	Extração, tratamento e armazenamento do óleo essencial..	28
4.3.2	Avaliação dos parâmetros de extração do óleo essencial	29
4.3.3	Características físico-químicas do óleo essencial	29
4.3.3.1	Densidade	29
4.3.3.2	Solubilidade em etanol 70%	29
4.3.3.3	Índice de refração	29
4.3.3.4	Cor e aparência	30
4.3.4	Quantificação do eugenol no óleo essencial	30

4.3.4.1	Determinações voltamétricas	30
4.3.4.2	Determinações espectroscópicas no UV-Vis	31
4.3.4.3	Determinação pelo método da normalização	32
4.4	Teste da atividade antibacteriana	32
4.4.1	Bactérias testadas	32
4.4.2	Susceptibilidade ao óleo essencial, padrão de eugenol e metileugenol	32
4.4.2.1	Preparo do inóculo	32
4.4.2.2	Semeadura das placas	33
4.4.2.3	Susceptibilidade aos antibacterianos convencionais	33
 CAPÍTULO 5		
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Estudo dos parâmetros de extração do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	34
5.2	Características físico-químicas do óleo essencial	36
5.3	Análises espectroscópicas do óleo essencial	37
5.3.1	Análise espectroscópica na região do ultravioleta-visível ...	37
5.3.2	Análise espectroscópica na região do infravermelho	39
5.3.3	Análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de ¹³ C	42
5.4	Análise cromatográfica e espectroscopia de massas do óleo essencial	45
5.5	Análise por voltametria	54
5.6	Quantificação do eugenol no óleo essencial	59
5.6.1	Determinação por UV	59
5.6.2	Determinação por voltametria	60
5.7	Susceptibilidade microbiana	64
 CAPÍTULO 6		
6.	CONCLUSÃO	74

CAPÍTULO 7	
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BR	Britton-Robson
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
CG	Cromatografia gasosa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EM	Espectrometria de massas
IE	Impacto de elétrons
Ipa	Corrente de pico Anódico
Ipc	Corrente de pico Catódico
IV	Infravermelho
M ⁺	Íon molecular
mV	Milivolts
ppm	Parte por milhão
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TMS	Tetrametil-silano
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
V	Volts
VPD	Voltametria de pulso diferencial

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Flores e folhas da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	07
Figura 2.1.	Frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	07
Figura 2.3.	Fórmula estrutural do eugenol.	09
Figura 4.1	Sistema utilizado na extração do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl.....	24
Figura 4.2	Diagrama esquemático da célula eletroquímica	30
Figura 5.1	Curva de extração do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl.....	35
Figura 5.2	Curva do rendimento de extração do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl.....	36
Figura 5.3	Espectros de absorção na região do UV para uma mistura etanol/água a 60 % (A), óleo essencial (B) e para o padrão de eugenol (C).....	38
Figura 5.4	Espectros na região do infravermelho do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial (B).....	39
Figura 5.5	Espectro de RMN de ¹³ C do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial (B)	43
Figura 5.6	Cromatograma do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	45
Figura 5.7	(A) Espectro de massa do eugenol, (B) proposta de identificação pela espectroteca NIST02.....	46
Figura 5.8	Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos.....	47
Figura 5.9	Espectro de massa do 1-octen-3-ol.....	49
Figura 5.10	Fragmentação do 1-octen-3-ol protonado e formação dos picos característicos.....	50
Figura 5.11	Espectro de massa do β -pineno.....	51

Figura 5.12	Espectro de massa do <i>o</i> -cimeno.....	52
Figura 5.13	Espectro de massa do limoneno.....	53
Figura 5.14	Ocorrência da reação de <i>retro</i> -Diels-Alder na fragmentação do limoneno	53
Figura 5.15	Espectro de massa do 5-indanol	54
Figura 5.16	Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo recém polido (A) e do padrão de eugenol (B) registrado em eletrólito suporte (etanol/tampão BR a 55%), pH 3,3 e com velocidade de 50 mV s ⁻¹	55
Figura 5.17	Dependência da corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial....	56
Figura 5.18	Formação do íon eugenoxônio na superfície do eletrodo de trabalho	56
Figura 5.19	Dependência da corrente de pico anódico de 5,8 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ do eugenol em função do pH na faixa de 2,3 a 8,8	58
Figura 5.20	Dependência do potencial forma de 5,8 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ do eugenol em função do pH na faixa de 2,3 a 8,8	59
Figura 5.21	(A) Curva de adição padrão da solução estoque do padrão sobre 20 µL de solução estoque da amostra do óleo essencial em mistura etanol/água a 60%; (B) Espectros de absorção da mistura etanol/água a 60% (1), da amostra (2) e das concentrações do padrão de eugenol: (3) 1,28 x 10 ⁻⁴ ; (4) 2,56 x 10 ⁻⁴ ; (5) 3,85 x 10 ⁻⁴ e (6) 5,12 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	60
Figura 5.22	Voltamogramas de pulso diferencial da amostra (1) e do padrão de eugenol (2 a 7), obtidos em solução 55% etanol/tampão BR pH 3,3	61
Figura 5.23	Curva da adição padrão obtida a partir do voltamograma de pulso diferencial da amostra e do	

	padrão de eugenol em solução 55% etanol/tampão BR pH 3,3	62
Figura 5.24	Atividade antibacteriana do óleo essencial (A) e do padrão de eugenol (B) contra a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
Figura 5.25	Atividade antibacteriana do óleo essencial contra as bactérias <i>Staphilococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> . ..	67
Figura 5.26	Atividade antibacteriana do óleo essencial contra as bactérias <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Serratia odorifera</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Propriedades físico-químicas do óleo essencial extraído de frutos da espécie <i>Pimenta dioica</i> Lindl	37
Tabela 5.2	Principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl na região do infravermelho	41
Tabela 5.3	Deslocamentos químicos teóricos e experimentais de ¹³ C do eugenol e do óleo essencial (a partir do TMS) com suas respectivas multiplicidades	44
Tabela 5.4	Composição química do óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	48
Tabela 5.5	Comparação entre as técnicas analíticas de cromatografia, espectroscopia e voltametria de pulso diferencial para determinação quantitativa do eugenol no óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	63
Tabela 5.6	Sensibilidade das bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Serratia odorífera</i> ao óleo essencial dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl e aos padrões de eugenol e metileugenol, utilizando-se o método de difusão em disco	64
Tabela 5.7	Sensibilidade das bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Serratia odorífera</i> frente a alguns antibióticos	70

Título: ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Pimenta dioica* Lindl

Autor: Joelkson Diniz Ribeiro

Orientadores: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais, *Pimenta dioica*, Eugenol, Voltametria, Atividade bactericida

RESUMO

As plantas vêm cada vez mais despertando o interesse da comunidade científica como fonte natural de substâncias antimicrobianas e, nesse contexto, o óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl tem se mostrado bastante promissor. Os melhores parâmetros de extração do óleo essencial dos frutos dessa espécie foram determinados por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, o que resultou em rendimento médio de 2,16% (m/m). Além das propriedades físico-químicas como densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência, o óleo essencial foi também caracterizado por técnicas espectroscópicas de UV, IV e RMN ^{13}C , bem como por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Foram identificados dezessete componentes no óleo essencial, onde o eugenol é o componente majoritário e cujo teor foi determinado por voltametria de pulso diferencial e por espectroscopia no UV. Avaliou-se ainda a atividade antibacteriana do óleo essencial, do padrão de eugenol e do metileugenol sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera* (isoladas de alimentos) e os resultados comparados com os testes feitos com antimicrobianos comerciais para as mesmas bactérias. O estudo microbiológico revelou que o óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl apresentou excelente atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, sendo que o eugenol é o principal responsável por essa eficácia.

Title: ANALYTICAL STUDY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF THE SPECIE *Pimenta dioica* Lindl

Author: Joelkson Diniz Ribeiro

Advisors: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

KEY WORDS: Essential oils, *Pimenta dioica*, Eugenol, Voltammetry, antibacterial activity

ABSTRACT

The plants have been arousing the scientific community interest as a natural source of antimicrobial substances and, in this context, the essential oil of the *Pimenta dioica* Lindl specie has been showing itself very promising. The best parameters of extraction of the essential oil from the fruits of this specie were determined by hydrodistillation in appliance Clevenger, what resulted in yield average 2.16% (m/m). Besides the physic-chemical properties as density, refraction rate, solubility, color and appearance, the essential oil was also characterized by UV spectroscopic techniques, IV and NMR ¹³C, as well by gas chromatography coupled to mass spectrometric. Were identified seventeen compounds in the essential oil, where the eugenol is the majority compound which content was determined by differential pulse voltammetric wrist and by spectroscopy UV. Was still evaluated the essential oil's antibacterial activity pattern eugenol and methyleugenol over *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera* bacteria (isolated from food) and the results compared with tests done with commercial antimicrobials to the same bacteria. The study microbiologic showed that the essential oil of *Pimenta dioica* Lindl presented excellent antibacterial activity against all the tested bacteria, being the eugenol the main responsible for this efficiency.

CAPIÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Plantas foram e continuam sendo laboratórios naturais para a descoberta de novos medicamentos. A prática do seu uso remonta às antigas civilizações que as utilizavam tanto no tratamento de diversas enfermidades que os assolavam quanto em rituais religiosos (VEIGA JUNIOR, 2008). A experimentação empírica proporcionou ao homem reunir informações sobre plantas que apresentavam propriedades terapêuticas, chamadas plantas medicinais, que por sua vez culminou na produção dos primeiros medicamentos e no tratamento farmacológico de doenças. A descoberta dos princípios farmacológicos ativos e, conseqüentemente, dos primeiros medicamentos sintéticos, só foi possível graças ao desenvolvimento da química no século XIX e aos estudos "in vitro" e em animais, os quais garantiram a dosagem terapêutica e tóxica de um medicamento. Avanços no conhecimento, como a descoberta dos fatores etiológicos causadores de doenças, principalmente as veiculadas por alimentos e águas, permitiram a aquisição de drogas específicas que combatessem tais agentes, assim como as doenças causadas por eles.

Apesar desses avanços, a humanidade continua sendo assolada por doenças causadas por microrganismos, as quais têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas, principalmente pela resistência adquirida a antimicrobianos (OLIVEIRA e SILVA, 2008). Tal resistência persiste até mesmo em ambiente hospitalar, onde medidas corriqueiras de assepsia de aparelhos e salas destinadas a cirurgias, higienização das mãos, isolamento de pacientes e treinamento de pessoal não têm sido suficientes para barrar o avanço das infecções de origem bacteriana (PASKOVATY *et al.*, 2005). Estima-se que cerca de 70% de várias cepas de bactérias patogênicas são resistentes a um dos antimicrobianos comumente usados para combatê-las, e essa resistência está associada ao uso desordenado de antibióticos em hospitais, clínicas veterinárias ou por

pacientes que adquirem o medicamento sem uma orientação médica (DUFFY *et al.*, 1999; CDC, 2001; HOEFLER *et al.*, 2006).

A saída seria a busca por novos compostos com atividades biológicas; nesse contexto, os óleos essenciais têm se mostrado bastante promissores conforme se observa em inúmeras publicações científicas. Dessa forma, conhecer sua composição e determinadas propriedades físico-químicas possibilita uma aplicação mais adequada desses óleos.

Neste trabalho, visando corroborar com os conhecimentos acerca dos óleos essenciais como agente antimicrobiano, servindo como proposta, estudos foram realizados com o óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com o propósito de testar a sua atividade antibacteriana sobre bactérias patogênicas. Tal óleo foi caracterizado através da espectroscopia (UV-Vis e IV), ressonância magnética nuclear de ^{13}C , cromatografia gasosa e espectrometria de massas. No mesmo, há também a sugestão de uma metodologia alternativa para determinação e quantificação eletroquímica do componente majoritário do óleo.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos essenciais

Pode ser considerada como Planta Medicinal qualquer planta que possua em um ou mais dos seus órgãos (folha, caule, fruto, raiz etc), substâncias biologicamente ativas (princípios ativos) com propriedades terapêuticas ou que sirvam como precursoras da síntese de fármacos (ANVISA, 2004).

Os óleos essenciais estão entre os constituintes ativos das plantas medicinais, os quais exercem funções primordiais à manutenção da espécie vegetal; tais como: a de defesa contra predadores e patógenos, bem como atrativo de polinizadores, aroma, entre outras (RAVEN *et al.*, 2001). Os alcalóides, flavonóides e taninos também estão entre aqueles que compõem os princípios ativos de uma planta – que pode chegar a mais de cem componentes (MARTINS *et al.*, 2003).

Devido a essa versatilidade, os óleos essenciais vêm sendo utilizados com diversas aplicações comerciais, seja como fixadores de perfumes ou conservantes na indústria de alimentos (HOLLEY e PATEL, 2005; SANTOS *et al.*, 2006). No meio científico, pesquisas apontam sua potencialidade como atrativo de insetos (MONTEIRO, 2008), como estomáquicos (WEYERSTAHL *et al.*, 1999), antioxidantes (MORAIS *et al.*, 2006), analgésicos (HEJAZIAN, 2006), antipiréticos e anti-inflamatórios (ABENA *et al.*, 2003), como agentes antibacterianos (COSTA *et al.*, 2008) e fungicidas (2001; OXENHAM *et al.*, 2005), bem como a sua ação repelente, larvicida e propriedade inseticida contra mosquitos; o *Aedes aegypti*, por exemplo (COSTA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007; TELES, 2009).

A *International Organization for Standardization* (ISO), na sua Reunião Plenária realizada em março de 1968, em Lisboa, definiu óleos essenciais como sendo óleos voláteis, geralmente odoríferos, que ocorrem em certas plantas ou partes especificadas de plantas e que são obtidos

por destilação por arraste a vapor d'água ou por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (limão, laranja etc). Por outro lado, o Ministério da Saúde, no seu Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961, estabeleceu como sendo óleo essencial o produto aromático, sávido, volátil, sob a forma oleosa, extraído de vegetais.

Quimicamente, os óleos essenciais são misturas homogêneas formadas por uma quantidade variada de substâncias orgânicas de diferentes funções: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas. Tais compostos podem estar presentes em diferentes concentrações, variando de baixíssimas quantidades a valores elevados, onde normalmente um é majoritário (MELO, 2005). No entanto, a grande maioria é constituída por moléculas bastante voláteis de baixo peso molar, as quais são derivadas de fenilpropanóides e de isopreno, sendo que este último forma a classe dos terpenos ou terpenóides (SILVA *et al.*, 2003).

2.1.1 Processos de extração

A escolha da técnica adequada para a extração do óleo essencial está intrinsecamente ligada à sua localização na planta, assim como a que se propõe a sua utilização, uma vez que cada método resulta em óleos com composição diferenciada, o que altera suas características físico-químicas e/ou propriedades bioativas. Tais características podem ainda ser influenciadas pelas condições operacionais empregadas para extração de óleos essenciais (POVH *et al.*, 2001). Dessa forma, o emprego adequado da técnica e a sua correta execução irão determinar a qualidade do óleo a ser usado.

Dependendo da espécie utilizada, os óleos essenciais recém extraídos podem apresentar-se com coloração que varia de incolor a coloridos e com densidades entre 0,690 e 1,118 g cm⁻³ (SIMÕES e SPITZER, 2003). São instáveis na presença de luz, calor, umidade, metal e oxigênio, os quais podem desencadear processos de

polimerização, ciclização, dimerização e oxidação, resultando em alterações na sua composição química e coloração original. Outras características dos óleos voláteis são o índice de refração e a atividade óptica, sendo tais propriedades utilizadas na sua identificação e no controle de qualidade (VITTI e BRITO, 2003).

As técnicas de extração comumente empregadas são a enfloração (enfleurage), destilação por arraste de vapor d'água, prensagem, extração com solventes orgânicos e extração por fluido supercrítico (SANTOS *et al.*, 2003).

Embora a extração por fluido supercrítico apresente maior rendimento frente às demais técnicas, originando extratos livres de resíduos obtidos em baixas temperaturas (o que preserva a qualidade de compostos termossensíveis), o elevado custo de sua aplicação (equipamento e gás) inviabiliza sua popularidade, além de fornecer óleos constituídos por outras substâncias que não são voláteis (ZANCAN *et al.*, 2002). Dessa forma, a extração por arraste de vapor d'água acaba sendo uma boa alternativa (com baixo custo) na obtenção de óleos essenciais, já que se trata de destilação simples e os óleos obtidos apresentam elevada pureza em voláteis.

A extração por arraste de vapor pode ser realizada de três formas, sendo a hidrodestilação e a destilação a vapor d'água as mais utilizadas. Na primeira, o material a ser destilado permanece diretamente em contato com a água em ebulição enquanto, na segunda, a matéria-prima é submetida a uma corrente de vapor proveniente de uma caldeira. Independente da forma de extração, o vapor promove a quebra das bolsas intercelulares que contêm o óleo essencial e o arrasta; a mistura dos vapores de óleo e água, ao condensar, se separam em camadas, devido à diferença de densidade (SIMÕES e SPITZER, 2003; TRABBOLD, 2008).

Os óleos obtidos na extração por arraste de vapor são normalmente emulsionados e de odor correspondente ao do principal

constituente do óleo essencial. Obtêm-se ainda uma fração aquosa de coloração inicialmente esbranquiçada chegando a incolor, denominada hidrolato, e que apresenta traços do óleo essencial (GUIMARÃE *et al.*, 2000).

Devido à facilidade na montagem, a extração de óleos essenciais em níveis laboratoriais é feita por hidrodestilação, onde comumente é utilizado um balão contendo a matéria-prima e água, acoplado a um sistema extrator, como o extrator de Clevenger. Tal procedimento foi o mesmo utilizado neste trabalho.

2.2 *Pimenta dioica* Lindl

Originária da América Central, México e Oeste da Índia, essa espécie – também conhecida como pimenta da Jamaica – pertence à família Mirtaceae, que compreende cerca de 140 gêneros e 3.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, bem como Austrália temperada (WAGNER *et al.*, 1999; LANDRUM e KAWASAKI, 1997). No Brasil, é encontrada nas regiões sudeste e sul da Bahia, sendo esta região a principal produtora (OLIVEIRA, 2007).

A *Pimenta dioica* Lindl é uma árvore que se desenvolve muito bem em regiões tropicais úmidas e com precipitação pluviométrica distribuída, podendo atingir altura de 20 m (ou mais) e apresentando uma copa com formato ovalado. Origina flores de pequeno porte e de coloração branco-rosada, folhas elípticas alongadas (Figura 2.1) e frutos com formato esférico (diâmetro \cong 8 mm) que apresenta coloração escura quando secos (Figura 2.2).

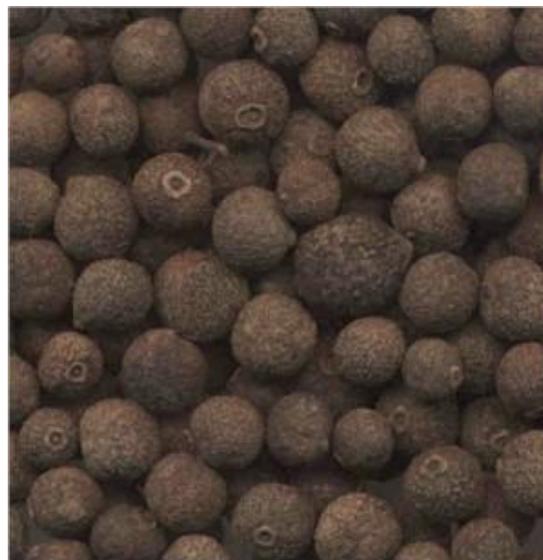
Essa espécie foi encontrada pela primeira vez na Jamaica por exploradores espanhóis, os quais acharam semelhança dos seus frutos secos com os grãos da pimenta preta, daí o nome usual. Por reunir um forte aroma e sabor de canela, gengibre, cravo-da-índia e noz-moscada (em inglês é denominada *allspice* – todas as especiarias), rapidamente se espalhou pelo mundo como um importante condimento, e a indústria de

alimentos passou a utilizá-lo para aprimorar o sabor de picles, ketchup, sorvete, molhos para salada etc, bem como na conservação de salsichas, salames e carnes (DUKE *et al.*, 2002). A demanda por esse condimento cresce a cada ano, tendo a Jamaica e o México como os maiores produtores e exportadores mundiais do fruto seco.



Fonte: WIKIMEDIA, 2008.

Figura 2.1 Flores e folhas da *Pimenta dioica* Lindl



Fonte: BOJENSEN, 2008.

Figura 2.2 Frutos da *Pimenta dioica* Lindl

Além do seu uso como condimento, a *Pimenta dioica* Lindl tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de resfriado, hemorragias, estomatites, cólica, diarreia infantil, náuseas, calafrios, flatulência, constipações, indigestão, reumatismo, entre outros (DUKE *et al.*, 2002).

Seus frutos e folhas fornecem um óleo essencial com aroma semelhante ao do cravo-da-índia e coloração que varia de amarelo claro a castanho avermelhado, a qual depende da região geográfica e da parte da planta (ISO 4729). O fruto seco contém 2 a 5% de óleo essencial contra 2 a 3% nas folhas, nos quais o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), Figura 2.3, aparece como componente majoritário com cerca de 65 a 85% no fruto e de 70 a 77,9% nas folhas (GONZÁLEZ DE COSÍO, 1984; MINOTT e BROWN, 2007).

O eugenol, fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar $164,2 \text{ g mol}^{-1}$, apresenta-se como um líquido incolor a amarelo claro (que escurece quando exposto à luz), volátil, baixa solubilidade em água, cheiro forte e aromático de cravo, sabor ardente e picante. Sendo o eugenol o componente majoritário do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, recomenda-se guardar seco tal óleo em frasco âmbar e em geladeira por questão visual, possível decomposição térmica e perda do seu componente majoritário.

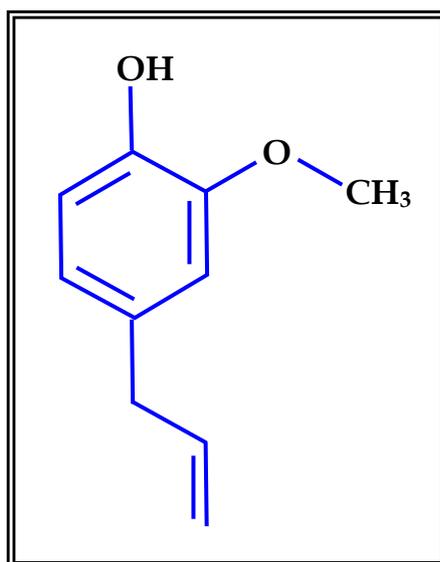


Figura 2.3 Fórmula estrutural do eugenol.

Dentre os compostos fenólicos voláteis, o eugenol tem se destacado pela sua elevada e comprovada capacidade flavorizante, antiespasmódico (MYINT *et al.*, 1996), antioxidante (PEREIRA, 2007), anestésico (VIDAL, 2007) e antipirético (LOPEZ, 1998), o que lhe confere relevante valor para as indústrias de cosméticos, alimentos, farmacêuticas e odontológicas. O eugenol é ainda o ponto de partida para a síntese da vanilina, importante matéria-prima na aromatização de doces, chocolates e sorvetes (DAUGSCH e PASTORE, 2005). Sua considerável capacidade de atrair insetos, tanto na forma pura como modificada (metileugenol e acetato de eugenila), pode vir a ser uma maneira segura e barata no controle de pragas agrícolas, substituindo os atuais defensivos agrícolas por atrativos de insetos, ou na avaliação de áreas em via de degradação através da diversidade e contagem de abelhas no ambiente, por exemplo (SOFIA e SUZUKI, 2004).

Além da *Pimenta dioica* Lindl, o eugenol é também encontrado em algumas espécies de manjeriço (MAROTTI *et al.*, 2005), no cravo-da-índia (MAZZAFERA, 2003), nas espécies de canela do gênero *Cinnamomum* (LIMA *et al.*, 2005) e no louro (*Laurus nobilis*), sendo que é

atribuído a esse fenol o aparecimento de doenças, como dermatite, queilites e estomatites, em pessoas que mantêm o contato freqüente com tais plantas ou com o óleo extraído delas (DIÓGENES, 1999).

Embora na literatura existam inúmeros trabalhos sobre diversas aplicações do eugenol, ainda há poucas publicações a respeito do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, principalmente como agente antimicrobiano. Corroborando essa afirmação, seguem importantes pesquisas levantadas da literatura com esse enfoque:

Rodríguez e colaboradores (1996) pesquisaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial e de um extrato a 70% da *Pimenta dioica* Lindl contra nove bactérias e treze fungos. Seus resultados mostraram que tanto o óleo essencial quanto o extrato apresentaram atividade bactericida e antifúngica contra todos os microrganismos testados, sendo que os melhores resultados foram obtidos como agente antifúngico.

Suárez *et al.* (1997), ao estudarem a ação do extrato etanólico e do extrato aquoso da *Pimenta dioica* Lindl em ratos, administrados por via intravenosa, descobriram que ambos tanto reduziam a pressão vascular como agiam no sistema nervoso central, demonstrando que a planta apresentava atividade hipotensora e efeito sedativo. Curiosamente, o efeito hipotensor do extrato aquoso foi significativamente maior (95% redução) do que o efeito do extrato etanólico (67% redução) para uma mesma dosagem (100 mg kg⁻¹). Em outro estudo, os mesmos autores (2000) demonstraram que a administração intraperitoneal de diferentes extratos de *Pimenta dioica* Lindl em ratos normais e hipertensos causava uma depressão do sistema nervoso central com dose-dependente, o extrato aquoso novamente teve maior atuação.

Rodríguez e outros pesquisadores (1997) avaliaram a atividade biológica de um creme do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl como repelente de insetos. Os estudos mostraram que o creme, quando comparado com outros repelentes sintéticos, apresentava repelência de 100%. Devido a tais resultados, os autores sugerem que o creme da

Pimenta dioica Lindl pode ser empregado para evitar enfermidades transmitidas por mosquitos, como a dengue hemorrágica.

López e colaboradores (1998) estudaram o efeito analgésico e antipirético do extrato da *Pimenta dioica* Lindl em ratos e coelhos, bem como a sua toxicidade. Os resultados mostraram que o extrato apresentou atividade antipirética e analgésica similares ao antiinflamatório ibuprofeno, porém em concentrações bem pequenas. Para os autores, o eugenol encontrado em grandes quantidades nas folhas da planta, que atua inibindo a liberação de prostaglandinas, pode ser o maior responsável por essas atividades, além disso, o ensaio toxicológico permitiu classificar o extrato como não tóxico.

Em uma linha de pesquisa diferente, Kikuzaki *et al.* (1999) identificaram e isolaram fenilpropanóides dos frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl. Outros cinco compostos, como o eugenol, também foram identificados. A estereoquímica de um fenilpropanóide foi determinada, bem como sua ação inibidora da auto-oxidação do ácido linoleico em um sistema de água-álcool. Em pesquisa posterior, o autor e outros colaboradores (2000) isolaram três novos galoilglucosídeos dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl e verificaram que tais substâncias apresentaram maior atividade antioxidante do que a atividade antioxidante das substâncias α -tocoferol e hidroxitolueno butilado (BHT).

Singh *et al.* (2003) avaliaram a ação antimicrobiana de óleos essenciais de cinco diferentes plantas sobre o fungo *Listeria monocytogenes* isolado de alimentos e observaram que o óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl e de duas outras espécies foram os que apresentaram o melhor efeito inibitório sobre o crescimento do referido fungo, *in vitro*.

Estudo semelhante foi realizado por Diaz e colaboradores (2003) quando testaram a ação antimicrobiana do óleo essencial das espécies *Ocimum gratissimum* L., *Ocimum tenuiflorum* L., *Pimenta dioica* Lindl e *Piper auritum* H.B.K sobre os fungos *Microsporum canis*, *Trichophyton*

mentagrophytes e *Tricophitun rubrum*, todos provenientes de isolamentos clínicos. Os resultados demonstraram a presença de atividade dos óleos sobre as espécies estudadas, onde o óleo da *Pimenta dioica* Lindl foi o que apresentou o melhor efeito sobre as espécies de fungos empregadas.

Sousa (2003) avaliou a concentração do eugenol no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl, tanto pela técnica de CG quanto por UV-Vis, e encontrou valores muito parecidos, de 85,5%. Como aplicação prática do óleo, o autor testou-o (juntamente com um padrão de eugenol) como atrativo de insetos.

Monteiro (2004) testou a ação antibacteriana do óleo dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl e do padrão de eugenol, encontrando ótimos resultados sobre cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Serratia* sp. e *Vibrio alginolyticus*. Ele comparou ainda sua atividade com as de antibióticos de largo espectro, constatando que (na maioria das vezes) a ação do óleo essencial se mostrou mais eficaz que a dos antibióticos testados. Em outro trabalho (2008), o autor demonstrou a capacidade do óleo essencial em atrair abelhas euglossina (*Eulaema cingulata*), resultado esse até então possível somente com o padrão de eugenol (SOFIA e SUZUKI, 2004).

Marinho (2005) comparou os resultados do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com os óleos de outras duas espécies sobre *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Providencia stuartii*. O estudo revelou que o óleo da *Pimenta dioica* Lindl apresentou os melhores resultados, o que reforça a sua eficácia como agente antibacteriano.

Em pesquisa semelhante, Nascimento e colaboradores (2007) estudaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de várias espécies vegetais sobre bactérias isoladas do bivalve *Mytella falcata* e observaram que o óleo da *Pimenta dioica* Lindl apresentou maior ação antibacteriana contra a bactéria *Escherichia coli*, quando utilizado o método de difusão em disco (MDD), e o segundo melhor resultado para o

Vibrio parahaemolyticus, quando utilizado o método de difusão radial em duas camadas de ágar perfurado (MDRCAP).

Costa Sobrinho (2007), ao estudar a ação antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* Lindl sobre cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*, verificou que todas as bactérias testadas foram sensíveis ao óleo e que ele apresentou uma melhor eficácia do que a dos antibióticos utilizados para efeito de comparação. O autor identificou o eugenol e o mirceno como constituintes do referido óleo, onde o eugenol é o componente majoritário com 74%.

Os trabalhos aqui apresentados mostram que a *Pimenta dioica* Lindl possui importantes propriedades úteis para o homem, entre elas a ação antibacteriana do seu óleo (extraído das folhas ou dos frutos) frente a alguns patógenos, considerando que tais propriedades se devem, principalmente, ao seu componente majoritário, o eugenol.

2.3 Aspectos gerais sobre voltametria

A voltametria tem se mostrado promissora na determinação de substâncias fenólicas quando comparada com outros métodos analíticos, devido a sua elevada sensibilidade e boa seletividade, além de oferecer a possibilidade de realizar estudo dos mecanismos eletródicos de oxidação e redução, bem como cinético (FRANCISCO *et al.*, 2007).

Segundo Skoog e colaboradores (2005), a voltametria corresponde ao conjunto de técnicas eletroanalíticas, pela qual informações sobre a identificação e quantificação de uma determinada espécie contida em solução são obtidas através da medida da intensidade da corrente em função do potencial aplicado. As várias técnicas existentes distinguem-se basicamente no modo como a variação de potencial é aplicada, sendo esse determinante para a sensibilidade das análises (WANG, 2006).

As análises são realizadas em recipiente adequado, denominado célula eletroquímica, contendo uma solução eletrolítica (eletrólito suporte) que apresenta a espécie a ser determinada. O eletrólito suporte apresenta como principais funções a de reduzir a resistência do meio e eliminar a contribuição da corrente de migração. Em alguns casos, serve ainda para manter o pH num valor desejado (solução tampão) durante a leitura (AGOSTINHO *et al.*, 2004).

A célula é composta ainda por um eletrodo de referência (eletrodo de calomelano, Hg/Hg₂Cl₂, em KCl saturado ou Ag/AgCl em KCl saturado), por um eletrodo auxiliar (fio de Pt, Au, Ag ou uma vareta de carbono vítreo) e por um eletrodo inerte com potencial variado, denominado eletrodo de trabalho, onde ocorre eletrólise da espécie eletroativa.

O eletrodo de referência serve ao único propósito de fornecer um potencial elétrico constante e definido sem que seja substancialmente polarizado durante o experimento. Já o eletrodo auxiliar (também chamado de contra-eletrodo) é responsável por fornecer a corrente requerida pelo eletrodo de trabalho para sustentar a eletrólise (SKOOG *et al.*, 2005). Tais eletrodos encontram-se ligados a um potenciostato, o qual é responsável pelo fornecimento de potencial, pela avaliação da corrente gerada e envio de sinal para um dispositivo de registro, que origina uma curva corrente-potencial denominada voltamograma (VOGEL, 2002).

Materiais como mercúrio, platina, carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e ouro estão entre os utilizados na confecção do eletrodo de trabalho, o qual pode ser de vários tamanhos ou formas, estacionários ou rotatórios (FEI *et al.*, 2004). A sua escolha dependerá do critério de estabilidade e de seletividade frente à espécie que se deseja determinar (SOUZA, 1997).

A voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial foram as técnicas eletroanalíticas empregadas neste trabalho, cujos resultados são

precisos e de fácil interpretação. O eletrodo de trabalho escolhido foi o de carbono vítreo por atuar em potenciais suficientemente positivos (0 a + 1,5V) e em meio ácido, condições ideais para oxidar compostos fenólicos, como o eugenol (MITCHELL *et al.*, 1985).

2.3.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, proporcionando sua utilização nos campos da eletroquímica, bioquímica, química inorgânica e química orgânica (WANG, 2006).

O potenciostato é ajustado para varrer uma faixa de potencial que contemple o potencial de oxidação e de redução da espécie eletroativa. O voltamograma apresenta-se na forma de onda reversa, e sua altura corresponde à corrente gerada na redução (corrente de pico catódico, I_{pc}) e oxidação (corrente de pico anódico, I_{pa}) do composto, as quais são proporcionais à concentração da espécie eletródica. Respostas voltamétricas com essas características são denominadas reversíveis ou quase reversíveis. Quando o voltamograma apresentar apenas um dos picos, ou seja, pico anódico ou catódico, indica que a espécie investigada é eletroativa, porém o seu comportamento eletroquímico é do tipo irreversível (WANG, 2006).

Nos processos reversíveis, os picos catódico e anódico correspondentes apresentam-se bem definidos e próximos, obedecendo à relação da Equação (1)

$$\Delta E_p = (E_{pa} - E_{pc}) \approx (0,0592)/n \quad (1)$$

que também pode ser usada para determinar a quantidade de elétrons envolvida nos processos. Quando esses são realizados a 25 °C, a relação entre a corrente de pico I_{pa} (ou I_{pc}) e a concentração da espécie eletroativa é descrita pela equação de Randles-Sevcik:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2)$$

em que:

I_p = corrente de pico em ampère;

A = área do eletrodo, cm^2 ;

D = coeficiente de difusão, $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$;

C = concentração, mol cm^{-3} ;

v = velocidade de varredura, V s^{-1} ;

n = número de mol de elétrons envolvidos no processo.

Outra característica de sistemas reversíveis está na igualdade entre os módulos das correntes de pico anódica e catódica. Processos eletroquímicos que resultem em picos, cujos potenciais sejam ligeiramente acima de 59 mV e razão de corrente próxima à unidade, são considerados quase reversíveis (ANDRADE *et al.*, 2004). Ocorre ainda que o aumento da velocidade de varredura pode resultar em processos quase reversíveis ou até mesmo irreversíveis, mesmo sendo este reversível numa dada velocidade. Tal fenômeno está associado à redução da velocidade de transferência de carga ao eletrodo, devido ao aumento repentino de potencial com o acréscimo da velocidade, não permitindo que o equilíbrio na superfície do eletrodo seja atingido (ANDRADE *et al.*, 2004).

2.3.2 Voltametria de pulso diferencial

Nessa técnica, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma variação contínua do potencial para valores mais positivos (varredura anódica), o monitoramento das correntes geradas é feito antes e no final da duração do pulso. Essas correntes são subtraídas, já que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da

corrente faradaica. Essa diferença de corrente é relacionada graficamente com o potencial aplicado, gerando um voltamograma de picos de corrente com a forma de uma curva gaussiana, cuja altura é proporcional à concentração do analito (WANG, 2006).

A realização do experimento é feita aplicando-se inicialmente um potencial mais negativo que o potencial de meia onda da espécie a ser determinada, visando sua deposição sobre o eletrodo de trabalho. A etapa de deposição é sempre conduzida com agitação, pois a sensibilidade da técnica é altamente dependente das condições hidrodinâmicas. Ganhos da sensibilidade podem ser conseguidos aplicando-se um maior tempo de deposição ou ainda aumentando a altura do pulso, no entanto tais parâmetros devem ser cuidadosamente determinados uma vez que o aumento da corrente de pico vem acompanhado de uma diminuição na resolução, o que torna a quantificação mais difícil entre picos com pouco espaçamento em potencial (MOUCHREK FILHO, 1997).

A técnica de pulso diferencial é bastante seletiva quando comparada com a voltametria cíclica. Nela, a determinação simultânea de duas substâncias eletroativas só é possível se apresentarem uma diferença de potencial de meia onda de, pelo menos, 200 mV. Já na voltametria de pulso diferencial, essa diferença é de apenas 50 a 100 mV (CARDOSO, 2007).

Além da considerável seletividade, a voltametria de pulso diferencial possui ainda como vantagem frente à voltametria cíclica a sua capacidade de determinar baixas concentrações do analito, apresentando um limite de detecção da ordem de 10^{-7} até 10^{-8} mol L⁻¹ (BUFFLE e TEECIER-WAEBER, 2005).

2.4 Teste da atividade antibacteriana pelo método da difusão em disco

Corresponde a um dos métodos mais amplamente utilizados para o ensaio de susceptibilidade bacteriana, devido à simplicidade da

realização e interpretação dos resultados, além de ser um método reconhecido e recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Modificado e padronizado por Bauer e colaboradores em 1966, esse método é baseado nos princípios de difusão inibitória de agentes antimicrobianos em um meio de cultura apropriado contendo o agente patógeno a avaliar.

Nesse teste, pequenos discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados de antibiótico são dispostos numa placa de petri contendo ágar Mueller Hinton solidificado, e sobre o qual encontram-se inoculadas as bactérias a serem testadas, sendo em seguida incubadas por 18 a 24 horas em estufas a 35 °C. Durante esse período, o agente antimicrobiano irá difundir pelo meio e atuará negativamente (ou não) sobre o crescimento do microrganismo, o qual será visualmente identificado pelo aparecimento de uma área em volta do disco antibiótico onde as bactérias não se desenvolverão, denominada halo de inibição. Quanto maior for o seu diâmetro, mais susceptível é o microrganismo enquanto que a pequena ou nenhuma zona de inibição indica resistência por parte da bactéria (TAVEIRA *et al.*, 2004).

Na prática, os resultados obtidos são comparados com valores tabelados para cada antibiótico conforme critérios da CLSI (CLSI, 2008a).

2.5 Antibióticos

Segundo Trabulsi e Alterthum (2004), antibióticos são agentes que interferem nas diversas atividades da célula bacteriana, inibindo seu crescimento ou causando a morte do microrganismo. Quando o antibiótico provoca a eliminação do agente bacteriano, é denominado bactericida. Por outro lado, se o antibiótico somente inibir o crescimento e a reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata, recebe a denominação de bacteriostático. (TAVEIRA *et al.*, 2004).

Os antibióticos conseguem apresentar eficácia frente às células bacterianas, interferindo em etapas essenciais à manutenção e

perpetuação do microrganismo: inibição da atividade da membrana celular e síntese de proteínas formadoras da parede celular, ou ainda intervindo na síntese de ácidos nucleicos, como os cromossomos e o próprio DNA (TAVARES, 2001).

Além da comprovada eficácia dos antibióticos frente às bactérias, muitos não causam nenhum efeito a determinados patógenos, isso porque alguns desses microrganismos apresentam resistência natural ao medicamento ou a adquirem após contato com o antibiótico. Segundo Moreira (2004), o uso inadequado e exacerbado de antibióticos também podem levar à resistência bacteriana.

2.6 Considerações sobre as bactérias testadas

2.6.1 *Escherichia coli*

A importância da *E. coli* como patógeno humano tem sido reconhecida desde seu descobrimento, em 1885, pelo Dr. Theodor Escherich. Está relacionada com casos de diarreias, principalmente infantil, colites hemorrágicas (HC), infecções da bexiga, dos rins, infecções de feridas cirúrgicas, septicemia, síndrome urêmico-hemolítica (HUS), pneumonia e com meningite (BELL e KYRIAKIDES, 2000).

Segundo Jay (2005), seis tipos principais de *E. coli* são classificados em grupos específicos, os quais são baseados nos fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndrome clínica e distintos sorotipos de O:H, sendo eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difuso aderente (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteroemorrágica (EHEC).

São capazes de se desenvolverem entre 7 e 50 °C, tendo 37 °C como temperatura ideal. Conseguem sobreviver em estado de latência por vários meses em temperaturas de refrigeração; algumas cepas de EHEC podem crescer em alimentos ácidos (até pH 4,4) e com mínimo de

atividade de água (Aa), de 0,95. São facilmente destruídos sob cozimento a 70 °C (WHO, 2005).

2.6.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* possui mais de trinta espécies. A produção de enterotoxina está associada principalmente à espécie *S. aureus*, embora outras espécies (como *S. intermedius* e *S. hyicus*) também tenham sido reconhecidas como produtoras (ADAMS e MOSS, 2002).

Segundo Forsythe (2002), o *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns responsável por severas infecções em humanos. Está amplamente distribuído na natureza, sendo os humanos e os animais seus principais habitat.

Na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos, especialmente os de origem animal e seus derivados, o *E. aureus* destaca-se devido a sua alta prevalência e o risco de produção de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI e HAHN, 2000)

2.6.3 *Proteus mirabilis*

O gênero *Proteus* tem como habitat natural o trato intestinal do homem e de outros animais, sendo considerado um organismo oportunista já que pode ser achado em feridas, infusões e abscessos. A espécie *Proteus mirabilis* é freqüentemente encontrada em infecções humanas, responsável por 70 a 90% de todas as infecções (FERREIRA *et al.*, 2008).

Embora bactérias do gênero *Proteus* estejam freqüentemente relacionadas com deterioração de alimentos, toxinfecções provocadas por essas bactérias têm sido também relatadas (JAY, 2005).

2.6.4 *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas* pertencem a um grande grupo de bastonetes gram-negativos aeróbicos não fermentadores. São resistentes aos antimicrobianos mais comumente utilizados, inclusive as penicilinas e as cefalosporinas (SCHAECHTER *et al.*, 2002)

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* encontra-se bastante difundida na natureza e recebeu por vários autores a definição de bactérias ubíqua. Apesar de ser considerada um organismo que predominantemente tem a água fresca como habitat ideal (WHO, 2003), é uma bactéria patógena oportunista porque freqüentemente encontra-se envolvida em infecções hospitalares (LOUREIRO *et al.*, 2002).

2.6.5 *Serratia odorífera*

São bastonetes gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, importante agente causador de infecções hospitalares, com cepas resistentes a inúmeros antibióticos de largo espectro; entre eles, os betalactâmicos (KONEMAN *et al.*, 2001).

Serratia odorífera tem sido relacionada com surto de diarreia aguda ocorrido em seis municípios do Estado do Amazonas, no período de julho a outubro de 2003, com 27 óbitos de crianças menores de cinco anos (MS, 2005).

CAPÍTULO 3

3 OBJETIVOS

Neste trabalho, o óleo essencial extraído dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl foi estudado com o intuito de caracterizá-lo físico-quimicamente, quantificar seu componente majoritário (eugenol), bem como avaliar a sua capacidade como agente antibacteriano. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1 - Estabelecer as melhores condições de extração do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl;
- 2 - Extrair quantitativamente o óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl;
- 3 - Determinar algumas propriedades físico-químicas do óleo essencial;
- 4 - Caracterizar o óleo essencial por espectroscopia de ultravioleta-visível, infravermelho e ressonância magnética nuclear de carbono 13, além de determinar alguns de seus componentes por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas;
- 5 - Quantificar o componente majoritário do óleo essencial por técnicas espectroscópicas e voltamétricas;
- 6 - Testar a atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera* pelo método de difusão em disco, bem como comparar com a atividade do padrão de eugenol, metileugenol e de antibióticos comerciais.

CAPÍTULO 4

4 PARTE EXPERIMENTAL

A metodologia aqui empregada foi baseada, principalmente, em propriedades físico-químicas e eletroquímicas para a caracterização do componente majoritário do óleo do fruto da *Pimenta dioica* Lindl, bem como em testes microbiológicos para a investigação de sua ação contra microrganismos patógenos específicos.

Para tanto, foi de fundamental importância a parceria firmada entre a Central Analítica, Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA) e Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Águas (PCQA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), o Laboratório de Pesquisas e Ensaio de Combustíveis (LAPEC) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LRMN) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e o Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.1 Equipamentos

4.1.1 Sistema extrator

Para a extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, utilizou-se a hidrodestilação com extrator de Clevenger – empregado para extração de óleo menos denso que a água (SANTOS *et al.*, 2004) –, acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL, tendo uma chapa aquecedora como fonte geradora de calor (Figura 4.1).



Figura 4.1 Sistema utilizado na extração do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

4.1.2 Refratômetro

Utilizou-se um refratômetro AABE de bancada, modelo 2 WAJ, para as medidas de índice de refração.

4.1.3 Moinho elétrico

As amostras foram trituradas no moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo TE-340) do Pavilhão Tecnológico-UFMA.

4.1.4 Estufa bacteriológica

A estufa utilizada para as culturas bacteriológicas foi da marca Fanem, modelo 502.

4.1.5 Peagômetro

As medidas de pH foram efetuadas no peagômetro digital Metrohm, modelo 827, o qual foi calibrado com os tampões monoidrogenoborato de sódio (meio ácido) e biftalato de potássio (meio básico), resultando numa incerteza de 0,046% conforme certificado de calibração (nº E-7362/08) expedido pela DIGIMED.

4.1.6 Balança analítica

Utilizou-se uma balança analítica da METTLER, modelo AE - 240, com precisão de 10^{-4} unidades.

4.1.7 Análise espectroscópica na região do ultravioleta e visível

Foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis da Hewlett Packard, modelo Cary 50.

4.1.8 Análise espectroscópica na região do infravermelho

Analisou-se o óleo essencial por IV no espectrofotômetro Nicolet - 5SXC FTIR, equipado com detector TGS na faixa de $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. As amostras foram analisadas diretamente em janelas de KBr.

4.1.9 Análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C)

Utilizou-se um espectrômetro de RMN Brüker avance DRX 400 do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCar, com frequência de 400 MHz e 1000 varreduras, sendo usado como solvente clorofórmio deuterado.

4.1.10 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG - EM)

Para a determinação química do óleo, foi utilizada a análise por meio da cromatografia gasosa contendo uma coluna capilar VF-1ms 100% metilsiloxano (15 m x 0,25 mm; 0,25 μm de espessura de filme) com fase estacionária. O cromatógrafo encontrava-se acoplado a um detector seletivo de massas por impacto de elétrons (ambos Varian 2100) e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap), tendo hélio como gás de arraste, com fluxo na coluna de 1 mL min^{-1} .

Para as análises, foram injetadas alíquotas de 1 μL da amostra diluída (20 μL do óleo em 1,5 mL de hexano), fixando-se as seguintes condições: temperatura do injetor em 270 $^{\circ}\text{C}$; split de 1:50; programação de temperatura do forno de 60 a 200 $^{\circ}\text{C}$ (com taxa de aquecimento de 8 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) e de 200 a 290 $^{\circ}\text{C}$ (com taxa de aquecimento de 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$). No Espectrômetro de Massas, as temperaturas do manifold, ion trap e da linha de transferência foram, respectivamente, de 50 $^{\circ}\text{C}$, 190 $^{\circ}\text{C}$ e 200 $^{\circ}\text{C}$.

Os constituintes foram identificados por comparação dos resultados obtidos (índices de retenção e espectros de massa) com os dados da espectroteca do aparelho (NIST02) e literatura.

4.2 Soluções e reagentes

Todos os reagentes usados foram de pureza analítica. A água utilizada no preparo das soluções e na limpeza dos materiais empregados nas análises voltamétricas e espectroscópicas foi destilada e posteriormente purificada em um sistema NANOPURE (Ultrapure Water System), modelo D4741, já a água utilizada nas análises microbianas era destilada, porém esterilizada.

4.2.1 Solução tampão

Foi utilizado o tampão Britton-Robson (BR) em todos os experimentos eletroquímicos, o qual era ajustado ao pH desejado com uma solução NaOH 1,0 mol L⁻¹. Tal tampão era preparado com ácido bórico (H₃BO₃) 0,04 mol L⁻¹, ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,04 mol L⁻¹ e perclorato de sódio (NaClO₄) 0,10 mol L⁻¹, o que resultava numa solução de pH 1,8. O NaClO₄ tinha a função de manter a força iônica na casa de 10⁻¹.

4.2.2 Soluções estoque

As soluções padrões de eugenol (98% de pureza e procedência CHEM SERVICE) foram preparadas em diferentes concentrações para cada técnica analítica aplicada. Para a voltametria, utilizou-se uma solução estoque de concentração 5,79 x 10⁻³ mol L⁻¹, a qual foi preparada misturando-se 10 µL do padrão em balão de 10 mL e aferindo-se com uma solução etanol/tampão BR pH 3,3 a 55% (v/v). Já para a espectroscopia no UV, a solução estoque apresentava concentração de 5,79x10⁻² mol L⁻¹ e foi preparada acrescentando-se 100 µL do padrão de eugenol em um balão de 10 mL, aferido com solução etanol/água destilada a 60% (v/v). As soluções estoque do óleo essencial foram preparadas semelhantemente às do padrão de eugenol para cada método analítico, ou seja, 10 µL e 100 µL, respectivamente.

4.3 Metodologia experimental

Relaciona-se a seguir todos os procedimentos práticos envolvidos no desenvolvimento do trabalho.

4.3.1 Obtenção do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl

4.3.1.1 Origem e preparo da amostra

Os frutos utilizados neste trabalho foram provenientes da Cooperativa Agrícola Mista do Projeto Onça LTDA, localizada no município de Taperoá-BA, Brasil, coletados em agosto de 2005. São oriundos de árvores que possuem certificação orgânica do Instituto Biodinâmico (IBD), sob o número CA0212/05 (Apêndice A).

O material foi seco à sombra e sob ventilação natural, sendo em seguida acondicionado em sacos plásticos devidamente lacrados e guardados em local seco e arejado.

4.3.1.2 Moagem dos frutos

Os frutos secos foram triturados no moinho elétrico e o material obtido foi armazenado em frascos de polietileno para posterior extração do óleo essencial.

4.3.1.3 Extração, tratamento e armazenamento do óleo essencial

Para cada extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, utilizava-se uma parte do material moído para dez partes de água destilada (m/v), sem que excedesse em 50% a capacidade do balão. O melhor resultado foi obtido na mistura de 30 gramas dos frutos moídos para 300 mL de água destilada, apresentando um tempo de extração de 3,5 horas.

O óleo essencial obtido era seco por meio de percolação em Na_2SO_4 anidro, acondicionado em frasco de vidro protegido contra luz e guardado em geladeira até posterior análise.

Utilizando esse procedimento de extração, determinou-se o seu rendimento, o qual foi calculado na relação massa/massa a partir do

volume observado no próprio sistema de extração, sendo que, para tal cálculo, foi feita a extração em triplicata.

4.3.2 Avaliação dos parâmetros de extração do óleo essencial

Para a determinação dos parâmetros de extração, fez-se a hidrodestilação em sistema de Clevenger variando-se o tempo de extração em 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 horas, à temperatura de 100 °C.

4.3.3 Características físico-químicas do óleo essencial

As propriedades físico-químicas determinadas foram densidade, índice de refração, solubilidade em álcool, cor e aparência.

4.3.3.1 Densidade

A densidade do óleo essencial obtido foi determinada com o emprego de um picnômetro de 1,0 mL previamente seco e tarado. Tal vidraria foi então cheia com as amostras do óleo essencial a 25 °C e, em seguida, pesada.

4.3.3.2 Solubilidade em etanol 70%

Para esse teste, foram utilizados balões volumétricos de 10 mL contendo um volume constante do óleo essencial, sobre o qual era adicionado proporcionalmente volume crescente da mistura de álcool/água destilada a 70% (v/v) até a sua completa solubilização.

4.3.3.3 Índice de refração

As leituras eram feitas a 25 °C com o óleo colocado diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, empregando-se uma micropipeta.

4.3.3.4 Cor e aparência

A cor foi avaliada visualmente comparando-se sobre um fundo branco a coloração do óleo essencial com cores conhecidas. Também foi avaliada a transparência ou limpidez dos óleos por testes sensoriais.

4.3.4 Quantificação do eugenol no óleo essencial

4.3.4.1 Determinações voltamétricas

As medidas eletroquímicas foram realizadas com auxílio de um potenciostato, modelo CV50W, da Bioanalytical Systems, Inc., acoplado aos eletrodos e a um computador para captura dos dados, além de uma célula eletroquímica de vidro de 10 mL contendo tampa com entradas para os eletrodos (Figura 4.2). Utilizou-se ainda um agitador magnético para a voltametria de pulso diferencial.

O eletrodo de trabalho utilizado (área = 0,06 cm²), o de referência e o eletrodo auxiliar foram, respectivamente, de carbono vítreo, prata em solução de cloreto de prata (Ag/AgCl) e platina. O eletrólito suporte usado foi uma solução etanol/tampão BR pH 3,3 a 55%.

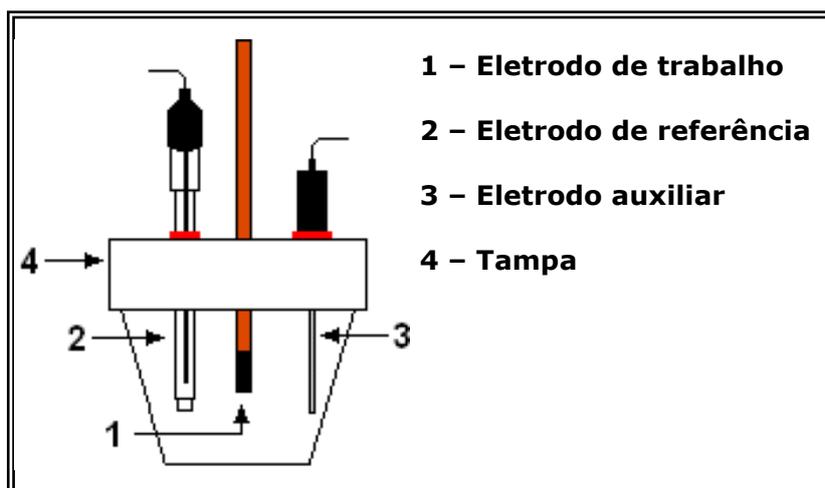


Figura 4.2 Diagrama esquemático da célula eletroquímica

A quantificação do eugenol, no óleo, foi determinada por voltametria de pulso diferencial com o método da adição padrão, para o qual 10 mL de uma solução contendo o óleo — preparada com 100 μL da respectiva solução estoque e com eletrólito suporte em um balão volumétrico — foi adicionado à célula eletrolítica e o valor da corrente da referida solução foi lido. Em seguida, adicionou-se volumes crescentes da solução estoque do padrão de eugenol, devidamente calculados, para resultar em concentrações de $2,0 \times 10^{-5}$ a $1,4 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , e as respectivas correntes eram lidas.

A cada leitura realizada, fazia-se necessária a renovação da superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que era observada perda de sinal devido à formação de um filme fenólico na sua superfície (FADANELLI, 1981). Essa renovação era obtida lixando o eletrodo sobre feltro contendo suspensão aquosa de alumina 0,3 μm , e a limpeza do eletrodo era feita com água ultrapura.

4.3.4.2 Determinações espectroscópicas no UV-Vis

Os testes foram realizados em comprimento de onda de 280 nm e com as amostras diluídas em solução de etanol/água destilada a 60% (v/v).

A quantificação do eugenol por essa técnica também foi determinada pelo método da adição padrão. Para tanto, foram utilizados cinco balões volumétricos de 10 mL (contendo cada um 20 μL da solução estoque do óleo essencial), nos quais se adicionou individualmente volumes crescentes da solução estoque do padrão de eugenol (0, 20, 40, 60 e 80 μL); sendo, em seguida, aferidos com a solução etanol/água destilada a 60%. A absorvância das novas soluções assim obtidas foi lida, tendo como branco a solução de etanol/água acima citada.

4.3.4.3 Determinação pelo método da normalização

A determinação da concentração do eugenol e dos demais componentes do óleo essencial por esse método foi obtida através da integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos, para as quais foi utilizado um software do próprio equipamento CG-EM (Varian 2100).

4.4 Testes da atividade antibacteriana

4.4.1. Bactérias testadas

As cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera* utilizadas neste trabalho foram provenientes de alimentos e isoladas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Maranhão.

4.4.2. Susceptibilidade ao óleo essencial, padrão de eugenol e metileugenol

A atividade antibacteriana do óleo essencial e do padrão de eugenol foi avaliada utilizando-se o método de difusão em disco recomendado pela CLSI (2008a).

Devido à semelhança da molécula do metileugenol com a do eugenol, diferenciando-se na presença de um grupo metil no lugar do hidrogênio da hidroxila desta última, optou-se também em verificar a sua ação como agente antibacteriano frente às bactérias testadas.

4.4.2.1 Preparo do inóculo

As culturas bacterianas foram inoculadas em caldo BHI (Brain and Heart Infusion), e, após 24 horas de incubação a 37 °C, procedeu-se a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (10^8 microrganismos mL⁻¹).

4.4.2.2 Semeadura das placas

O inóculo de cada cultura bacteriana (0,10 mL) foi semeado com swab estéril na superfície das placas contendo ágar Mueller Hinton solidificado, e sobre a mesma foram aderidos, com auxílio de uma pinça previamente flambada, pequenos discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados, individualmente, com 75 µL do óleo essencial e com os padrões (eugenol e metileugenol), sendo pressionados levemente sobre a superfície do meio.

As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas, e a leitura dos halos de inibição foi feita com a utilização de uma régua milimetrada, certificada pelo INMETRO.

4.4.2.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais

O comportamento das cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera* foi testado frente à ação de antimicrobianos comerciais seguindo o método de difusão de disco (CLSI, 2008a), conforme discutido no item 4.4.2.1 e 4.4.2.2. Os discos impregnados com os antimicrobianos foram distribuídos nas placas com o auxílio de uma pinça previamente flambada, sendo em seguida levemente pressionados contra a superfície do meio. Na seqüência, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Os antimicrobianos utilizados foram escolhidos pela sua eficácia ao respectivo microrganismo conforme recomendação da CLSI (2008b), sendo estes: tetraciclina (TET 30 µg), vancomicina (VAN 30 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), ampicilina (AMP 10 µg), cloranfenicol (CLO 30 µg), eritromicina (ERI 15 µg), gentamicina (GEN 10 µg), sulfazotrim (SUT 25 µg) e penicilina (PEN 10 µg).

Os halos de inibição obtidos foram comparados com os valores da tabela padrão de sensibilidade dos discos antimicrobianos (Apêndice B).

CAPÍTULO 5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo dos parâmetros de extração do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl

O estudo mostrou uma relação na quantidade da biomassa com um volume mínimo de água, o qual influenciava consideravelmente no rendimento da extração e aspectos visuais do óleo. Quando era utilizada uma quantidade de água inferior à mínima requerida, havia o risco de queima da amostra e o baixo rendimento da extração. Por outro lado, a extração quando era realizada com uma quantidade exagerada de água, além do aumento do tempo de extração, ocorria ainda formação de hidrolato em grande quantidade. Dessa forma, optou-se em determinar o volume de água que resultasse num maior rendimento do óleo, além do tempo mínimo de extração.

A Figura 5.1 mostra a proporção mínima de água necessária ao máximo de extração, na qual foi fixada uma massa de amostra em 30 g e variada a quantidade de água destilada até o volume de 300 mL. O estudo revelou que a partir de uma razão de água oito vezes maior que a massa da amostra utilizada já se chegava à sua extração máxima. No entanto, com intuito de garantir que a extração ocorresse sem o risco de queima da amostra, adotou-se nas extrações do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl uma proporção de 1/10 (m/v).

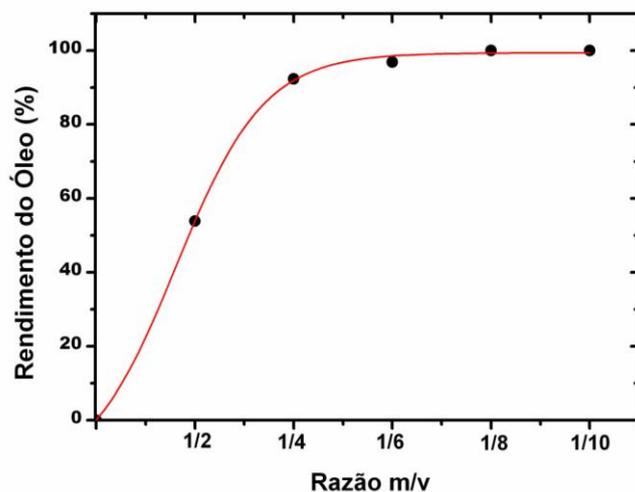


Figura 5.1. Curva de extração do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

Na Figura 5.2, é mostrada a relação entre o rendimento percentual do óleo e o tempo de extração para uma mesma massa de amostra (30 g) com 300 mL de água destilada. A extração foi considerada concluída quando o incremento de tempo não alterou o volume de óleo já extraído, o qual ocorreu após 3,5 horas.

Tendo por base os parâmetros determinados, o rendimento da extração pôde então ser calculado. Partindo de uma massa de 30 g, o valor médio do óleo extraído era de 0,67 mL, o que resultou num rendimento de 2,16% (m/m). Tal resultado foi considerado elevado quando comparado com o rendimento na extração de outros óleos essenciais (EHLERT *et al.*, 2006), bem como superior ao valor encontrado por Oliveira e colaboradores (2007) na extração do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl, cerca de 1,1% (v/m), além do tempo de extração ter sido menor que o utilizado pelos autores (cinco horas) para a mesma técnica de extração aqui empregada.

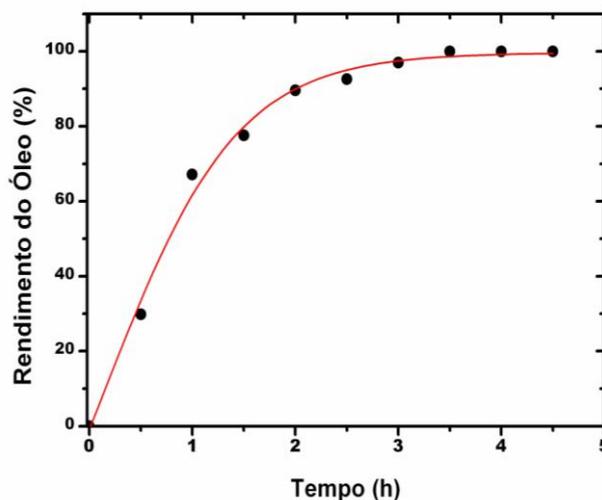


Figura 5.2 Curva do rendimento de extração do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

5.2 Características físico-químicas do óleo essencial

Algumas características físico-químicas do óleo essencial dos frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl foram determinadas e mostradas na Tabela 5.1, bem como as encontradas pela literatura. Tais características são específicas a óleos essenciais e servem de parâmetros para avaliar a pureza do produto (SIMÕES e SPITZER, 2003).

A comparação entre os valores encontrados e os valores da literatura mostra que algumas características físico-químicas são concordantes entre si e que outras, como densidade e índice de refração, apresentam similaridade dos resultados. A variação observada no rendimento é atribuída à época e região de colheita uma vez que ambos utilizaram o mesmo método e procedimento de extração. Forma de armazenamento e período de extração podem também influenciar no rendimento do óleo obtido (FARIAS, 2001).

Tabela 5.1 Propriedades físico-químicas do óleo essencial extraído de frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl.

Propriedades Físico-químicas	Literatura		Experimental encontrado
	Mouchrek Filho (2000)	Monteiro (2008)	
Densidade (g mL ⁻¹)	0,997	0,949	0,968
Índice de refração (N _D ^{25°})	1,521	1,332	1,518
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:2	1:2	1:2
Rendimento (% m/m)	1,60	2,80	2,16
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido
Odor	Ctco	Ctco	Ctco

Ctco = característico

5.3 Análises espectroscópicas do óleo essencial

5.3.1 Análise espectroscópica na região do ultravioleta - visível

No presente trabalho, utilizou-se a espectroscopia UV-Vis tanto para investigar a presença do eugenol no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl quanto para a sua caracterização eletrônica e determinação do seu teor no óleo.

A Figura 5.3 apresenta os espectros de absorção do padrão de eugenol, do solvente utilizado (solução etanol/água destilada a 60%) e do óleo essencial na região do UV.

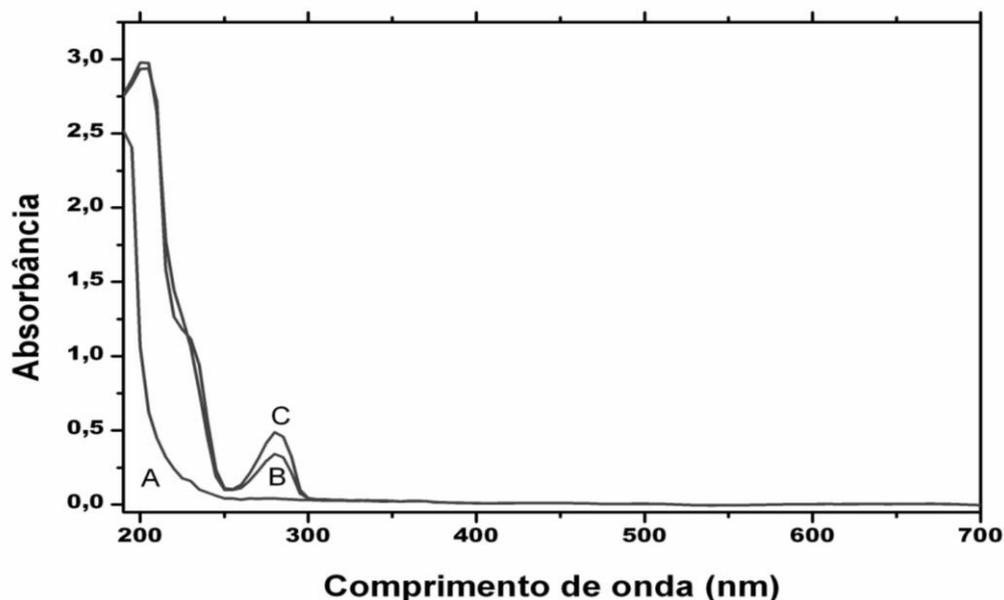


Figura 5.3 Espectros de absorção na região do UV para a solução etanol/água destilada a 60 % (A), óleo essencial (B) e para o padrão de eugenol (C).

Tanto o espectro do óleo (B) como o do padrão de eugenol (C) mostraram dois picos com absorção máxima nos comprimentos de onda 230 e 280 nm, sendo que a absorvidade molar (ϵ) a 280 nm para o padrão resultou em um valor aproximado de $3 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em solução etanol/água destilada a 60 %.

Essas bandas podem ser atribuídas à presença de compostos alifáticos insaturados (230 nm) e a compostos aromáticos com substituição auxocrômica (280 nm) como o grupo hidroxila, sendo ambas com transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$, embora unidades fenilpropílicas apresentem bandas com máximo de absorção no mesmo intervalo dos comprimentos de onda observados (UGAZ, 1994; SILVERSTEIN *et al.*, 2000). No entanto, ao se comparar o espectro do óleo essencial com o espectro do padrão de eugenol, nota-se que os mesmos praticamente se sobrepõem indicando que o eugenol encontra-se presente no óleo essencial como componente majoritário.

5.3.2 Análise espectroscópica na região do infravermelho

Na Figura 5.4, estão apresentados os espectros do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl (B) na região do infravermelho. Nota-se que todas as bandas de absorção do óleo coincidem na mesma frequência das bandas de absorção do padrão, indicando a presença de eugenol na sua composição. A forte semelhança aponta ainda ser o eugenol o componente majoritário no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

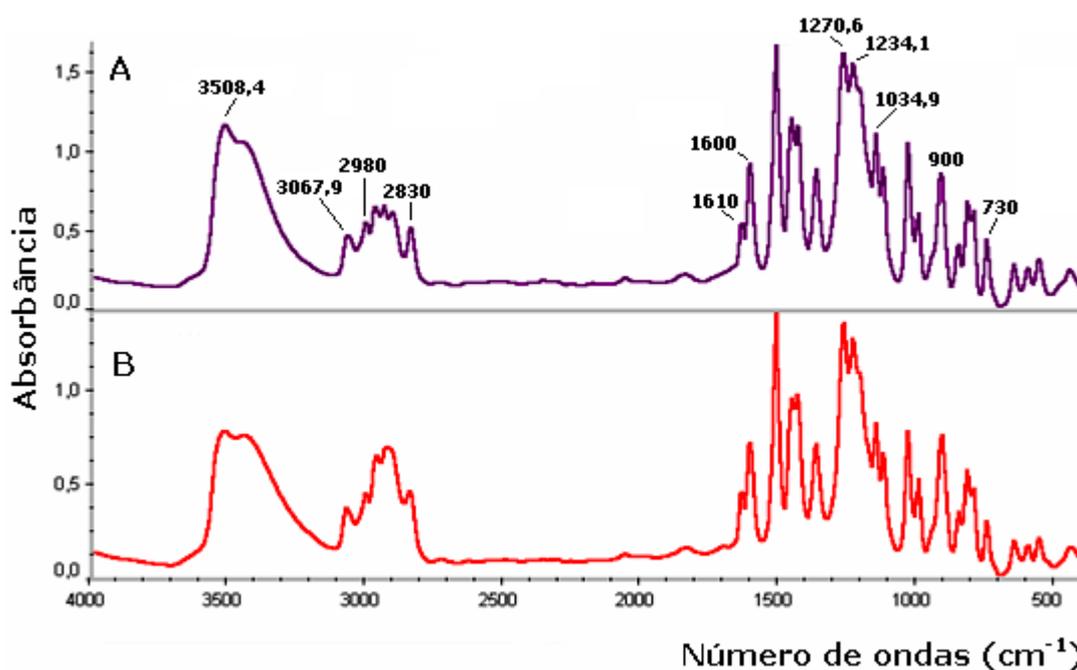


Figura 5.4 Espectros na região do infravermelho do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial (B).

Os espectros mostram uma forte banda de absorção na região de 3500, correspondente à deformação axial de OH. As bandas observadas em 2980 e 2830 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à deformação axial assimétrica e simétrica do grupo CH_2 , enquanto que a existente em 3068 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de C — H da estrutura benzênica. O estiramento da ligação C — O do grupo C — OH é

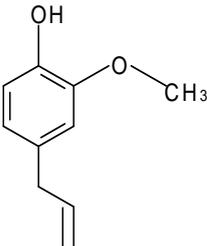
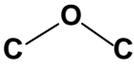
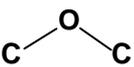
atribuído à banda observada em 1270 cm^{-1} , aquelas observadas em torno de 1234 e 1035 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos da ligação C — O do grupo metoxi (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Conforme a literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), o estiramento da ligação dupla do carbono aromático encontra-se em torno de 1595, 1499 e 690 cm^{-1} . Na Figura 3.4, tais estiramentos ocorreram em 1600, 1500 e 730 cm^{-1} ; a última banda é atribuída à deformação angular fora do plano, enquanto as outras são atribuídas à deformação axial.

O composto alifático da molécula de eugenol apresentou bandas características em torno de 1610 e 900 cm^{-1} tanto no óleo como no padrão, sendo a primeira banda atribuída à deformação axial da ligação C = C e a segunda à deformação angular fora do plano de =CH— (SILVERSTEIN *et al.*, 2007; PEREIRA e MAIA, 2007).

A Tabela 5.2 apresenta o $\lambda_{\text{máx}}$ dos principais estiramentos do padrão de eugenol e do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

Tabela 5.2 Principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl na região do infravermelho.

Composto (eugenol)	Tipo de deformação	Grupo Funcional	Tipo de ligação	Absorção (cm ⁻¹)	
				eugenol	óleo
	Axial	Hidroxila	O — H	3508,4	3513,5
	Axial	Aromático	C = C	1600,0	1600,0
	Angular plana	Hidroxila	O — H	1369,8	1372,9
	Axial	Aromático hidroxila	C — OH	1270,6	1270,5
	Axial assimétrica	Éter		1234,1	1234,7
	Axial simétrica	Éter		1034,9	1034,9
	Axial	Aromático	C — H	3067,9	3073,1
	Axial	Metila	C — H	2970,7	2965,6
	Axial	Alifático	C = C	1610,0	1615,0

5.3.3 Análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de ^{13}C

A Figura 5.5 mostra os espectros de RMN ^{13}C em estado líquido do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial (B).

No espectro referente ao padrão observa-se a presença de sinais que correspondem ao deslocamento químico dos carbonos do eugenol. O sinal com deslocamento químico em torno de 143,9 ppm é relativo ao carbono do anel aromático (C_1), no qual o grupo OH acha-se ligado. O carbono que se encontra ligado ao grupo OCH_3 (C_2) apresenta sinal em 146,5 ppm enquanto que os sinais em 111,2, 121,2 e 115,5 ppm são atribuídos aos carbonos do anel aromático ligado a hidrogênio, ou seja, C_3 , C_5 e C_6 . O sinal em 131,9 ppm é devido ao carbono do anel ligado ao grupo CH_2CHCH_2 (C_4), já os sinais em 39,9, 114,4 e 137,9 ppm são provenientes do deslocamento químico dos carbonos C_7 , C_9 e C_8 do grupo CH_2CHCH_2 . O carbono que se apresenta com maior intensidade em 55,8 ppm (C_{10}) deve-se ao seu grupo OCH_3 e a contribuição dos três átomos de hidrogênio.

No espectro do óleo essencial, aparecem deslocamentos químicos de vários carbonos; nele é notória a existência de sinais praticamente com mesma intensidade e posição dos carbonos do padrão de eugenol, o que confirma a presença dessa molécula no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl. Valores semelhantes foram obtidos por Cortez e colaboradores (1998) ao analisarem o óleo essencial da alfavaca, cujo componente majoritário é o eugenol.

A Tabela 5.3 apresenta os resultados dos valores teóricos e experimentais conforme deslocamentos químicos de ^{13}C do padrão de eugenol e do óleo essencial.

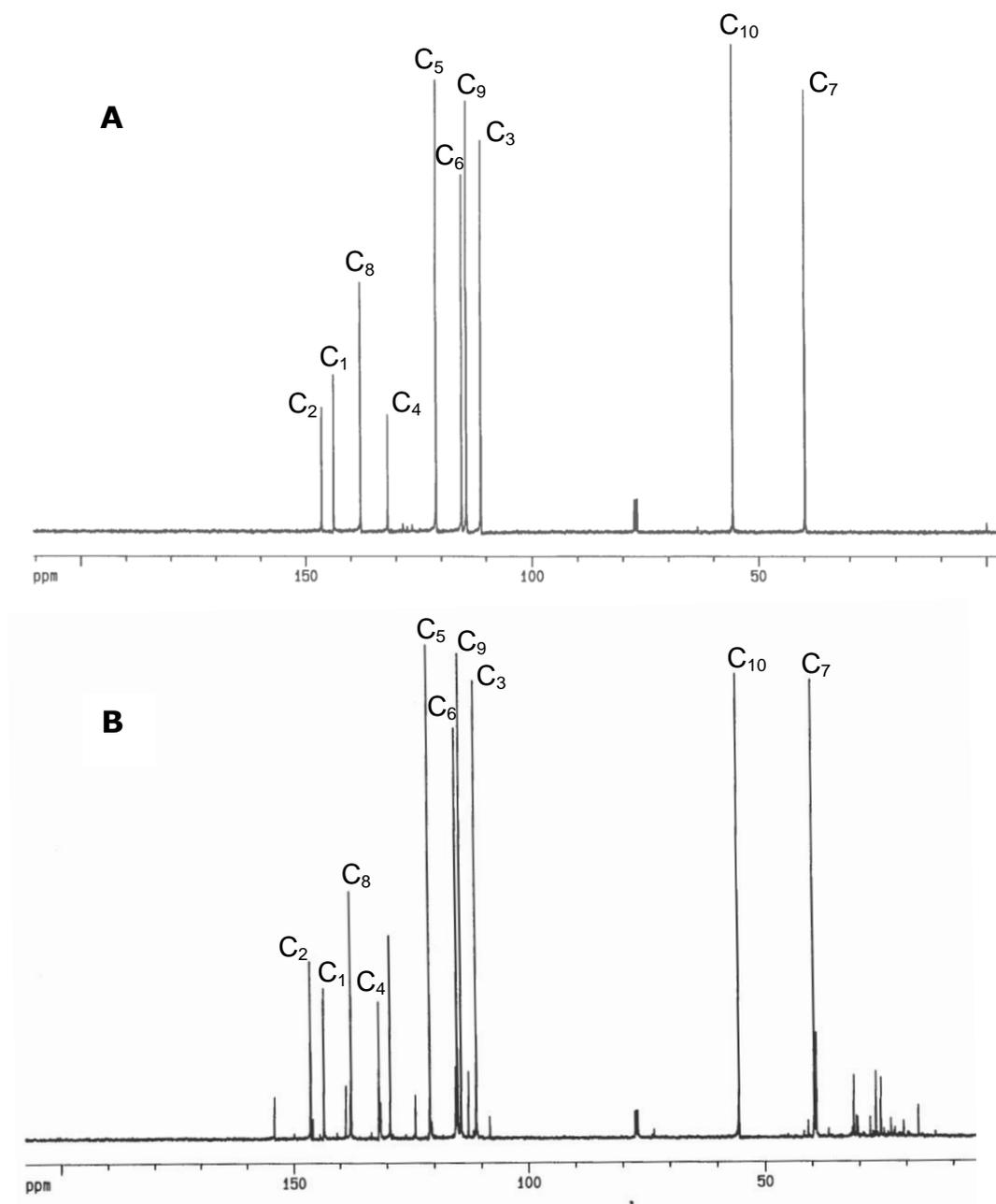
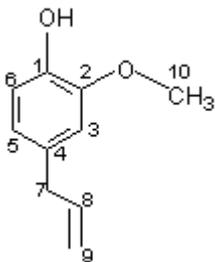


Figura 5.5 Espectro de RMN de ^{13}C do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial (B).

Tabela 5.3 Deslocamentos químicos teóricos e experimentais de ^{13}C do eugenol e do óleo essencial, a partir do TMS.

Composto (eugenol)	Átomo	δ (ppm)		
		Teórico	Padrão	Óleo essencial
	C ₁	140,7	143,9	143,5
	C ₂	147,2	146,5	146,4
	C ₃	113,3	111,2	111,1
	C ₄	131,3	131,9	131,7
	C ₅	122,4	121,1	120,9
	C ₆	116,8	115,5	115,2
	C ₇	34,4	39,9	39,6
	C ₈	137,1	137,9	137,6
	C ₉	113,2	114,4	114,9
	C ₁₀	54,1	55,8	55,4

5.4 Análise cromatográfica e espectroscopia de massas do óleo essencial

Por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa, foi possível identificar dezessete constituintes do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl, os quais são apresentados na Figura 5.6 conforme a ordem de eluição.

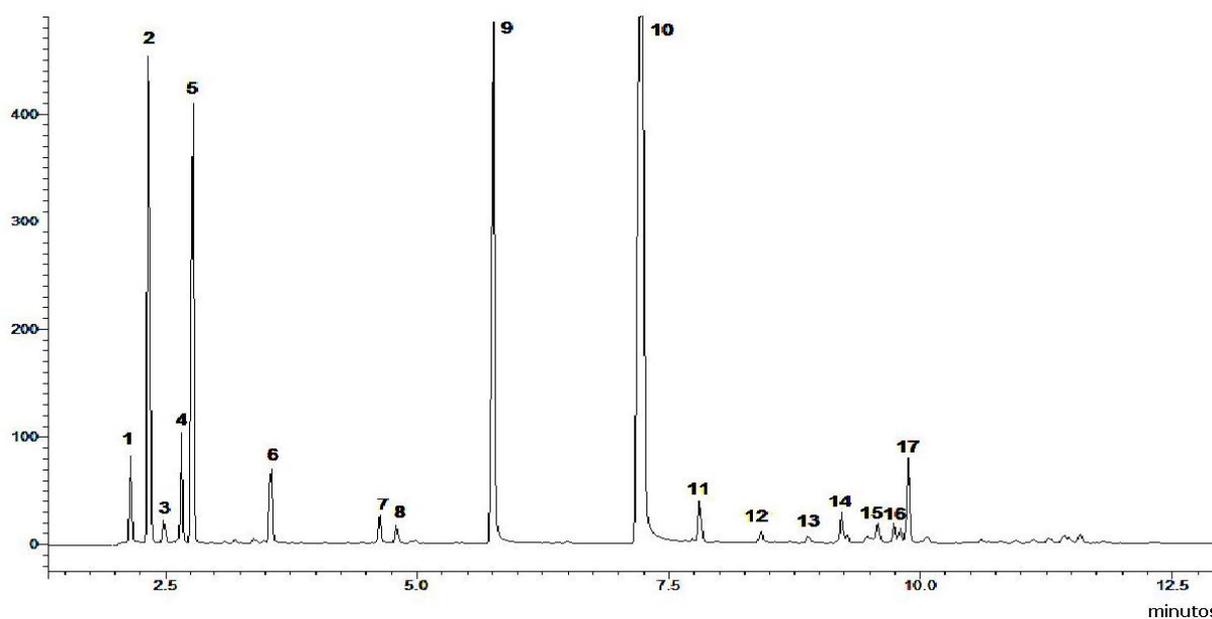


Figura 5.6 Cromatograma do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

O cromatograma mostra um pico mais intenso, com tempo de retenção em 7,184 minutos (pico 10), correspondente ao eugenol, o qual foi identificado por meio da comparação do seu espectro de massa com o fornecido pela espectroteca do aparelho (Figura 5.7) e com o espectro de massa do padrão de eugenol reportado por David *et al.* (2002) e Smith (2004). Os demais componentes também foram identificados utilizando-se a mesma metodologia adotada para o eugenol, além da comparação com

os espectros de massa encontrados na literatura (SMITH, 2004; ADAMS, 2007).

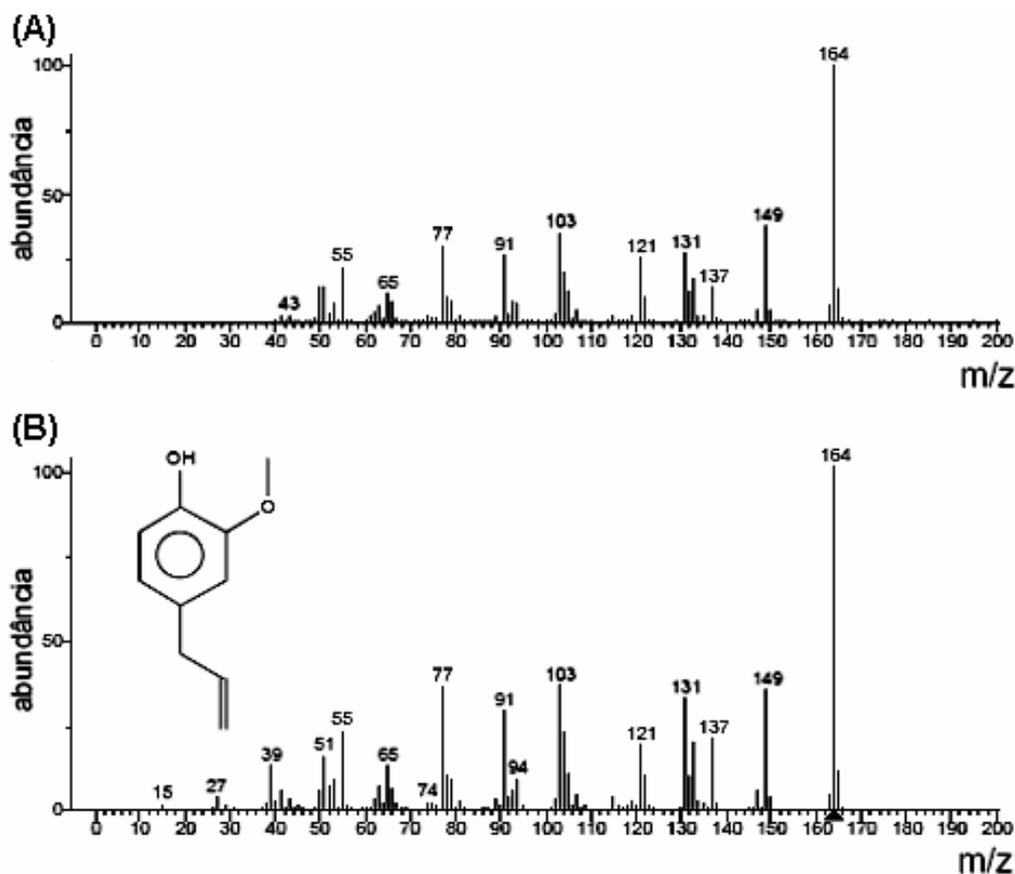


Figura 5.7 (A) Espectro de massa do eugenol, (B) proposta de identificação pela espectroteca NIST02.

Segundo a literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), fenóis apresentam um pico intenso correspondente ao íon molecular, o que facilita sua identificação. Observando-se a Figura 5.7, nota-se um pico intenso com m/z 164 [M^+], que é correspondente à fórmula $C_{10}H_{12}O_2$, confirmando a presença majoritária do eugenol no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl. Os espectros mostraram ainda picos típicos da quebra de fenóis e éteres aromáticos, sendo que o pico m/z 149 [$M - 15$] é característico da perda do radical metila e os picos m/z 77 e m/z 65 são correspondentes, respectivamente, aos íons [$C_6H_5^+$] e [$C_5H_5^+$] originados por rearranjo — com a saída do grupo CO; já o fragmento com

pico em m/z 133 [M-31] é referente à perda do grupo OCH_3 do éter (CORTEZ *et al.*, 1998; SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A Figura 5.8 ilustra o mecanismo de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol (CORTEZ *et al.*, 1998).

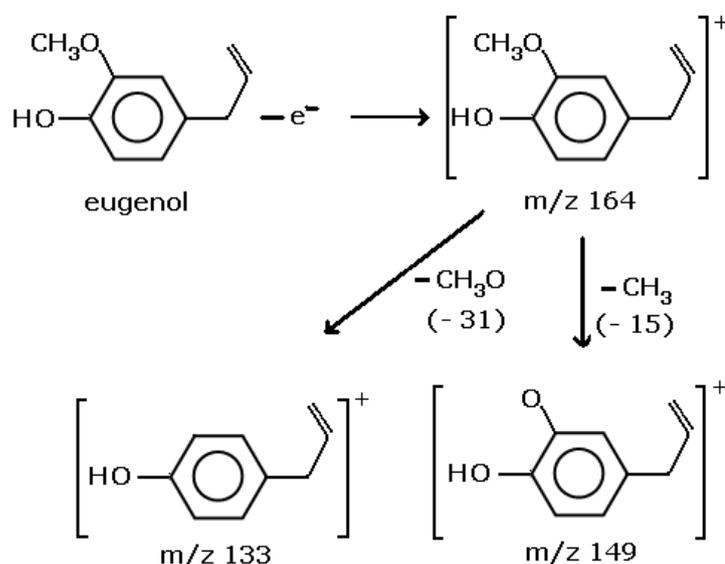


Figura 5.8 Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos.

A Tabela 5.4 mostra as substâncias presentes no óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, apresentadas na Figura 5.6, assim como o tempo de retenção de cada substância na coluna e o seu respectivo teor no óleo essencial, sendo que a quantificação do eugenol e dos demais componentes foram determinadas pela integração da área do pico correspondente. Nota-se que o eugenol aparece em maior quantidade (76,98%), caracterizando ser o componente majoritário do óleo essencial dos furtos da *Pimenta dioica* Lindl.

Tabela 5.4 Composição química do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

Pico	TR^a (min)	Substância identificada	Teor (%)	DP^b	CV^c (%)
1	2,15	1-octen-3-ol	1,40	0,04	2,49
2	2,33	β -pineno	6,52	0,08	1,27
3	2,49	α -pineno	0,28	0,00	1,79
4	2,66	o-cimeno	1,94	0,04	1,82
5	2,77	limoneno	4,09	0,05	1,32
6	3,56	linalol	0,64	0,02	2,38
7	4,64	cis-hidrato de sabineno	0,22	0,01	4,10
8	4,80	α -terpineol	0,13	0,01	4,23
9	5,76	5-indanol	5,88	0,20	3,42
10	7,23	eugenol	76,98	0,32	0,41
11	7,80	α -cubebeno	0,35	0,01	2,94
12	8,41	cariofileno	0,09	0,00	3,29
13	8,90	α -cariofileno	0,08	0,00	0,44
14	9,22	γ -muroleno	0,25	0,01	2,27
15	9,58	α -candideno	0,19	0,00	1,53
16	9,74	α -muroleno	0,22	0,01	4,16
17	9,88	δ -candideno	0,76	0,01	1,36

^atempo de retenção; ^bdesvio padrão; ^ccoeficiente de variação

A seguir são discutidos os picos da Tabela 5.4 que se apresentaram com teores acima de 1%, ou seja, os picos 1, 2, 4, 5 e 9.

A Figura 5.9 mostra o espectro de massa do pico 1, o qual após ser analisado pela espectroteca NIST02 e comparado com os dados da

literatura (RAMONI *et al.*, 2001; ADAMS, 2007), chegou-se à conclusão que se tratava da substância 1-octen-3-ol de fórmula $C_8H_{16}O$ e massa molar igual a 128 g mol^{-1} .

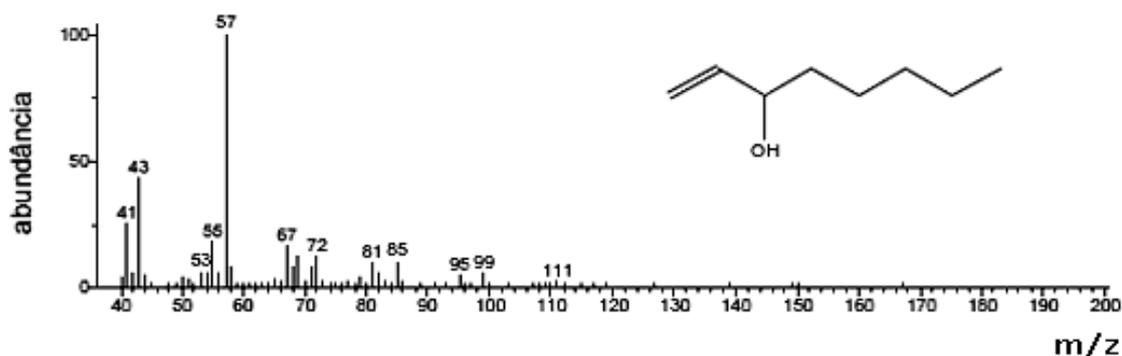


Figura 5.9 Espectro de massa do 1-octen-3-ol.

De acordo com a literatura (FERREIRA *et al.*, 2001; SILVERSTAIN *et al.*, 2007), álcoois secundários apresentam o pico do íon molecular com pouca intensidade, principalmente quando não apresentam clivagem α e quando o espectro de massa é obtido por impacto de elétrons, fatos que dificultam sua identificação. A substância 1-octen-3-ol é um álcool secundário, o que justifica a baixa intensidade do pico correspondente ao íon molecular m/z 128. No entanto, observa-se o pico característico m/z 57 do íon $[H_2C=CH-CH=HO]^{\bullet+}$, o qual é decorrente da quebra da ligação carbono-carbono vizinhos ao átomo de oxigênio com liberação do maior grupo, ou seja, o radical $[CH_3-(CH_2)_3-H_2C]^{\bullet}$. Este último por se tratar de um fragmento longo, sofre ainda fragmentação semelhantemente aos alcenos com liberação de grupo metileno, resultando no pico m/z 43. Buhr e colaboradores (2002) comentam que durante o processo de fragmentação o 1-octen-3-ol é protonado e sofre ressonância de estabilização com perda de água originando o íon $[CH_3-C=CH-(CH_2)_4-CH_3]^+$ com pico em m/z 111, que por sua vez sofre fragmentação resultando em outro íon característico em m/z 69 ($MH^+-H_2O-C_3H_6$). Já o pico m/z 99 [$M-29$] é atribuído à saída do grupo etil

(FERREIRA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN, *et al.*, 2007). A Figura 5.10 mostra os principais íons formados na fragmentação do 1-octen-3-ol protonado (BUHR *et al.*, 2002).

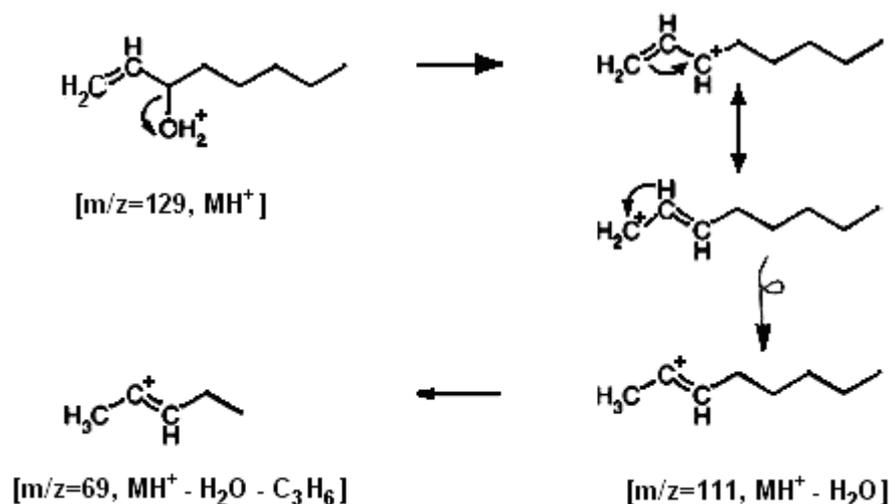


Figura 5.10 Fragmentação do 1-octen-3-ol protonado e formação dos picos característicos.

O pico 2 da Figura 5.6 foi identificado, segundo a espectroteca e a literatura (FEITOSA *et al.*, 2009; ADAMS, 2007), como sendo o β -pineno de fórmula $C_{10}H_{16}$ e massa molecular correspondente a 136 g mol^{-1} (Figura 5.11). Esse hidrocarboneto monoterpênico apresenta o pico molecular m/z 136 e o pico característico em m/z 121 $[M-15]$, referente à perda do grupo metil. O espectro de massa apresenta ainda os picos em m/z 107 $[M-15-14]$ e m/z 93 $[M-15-14-14]$, os quais são originados da subsequente perda do grupo metileno. O pico em m/z 41 é atribuído ao fragmento $C_3H_5^+$ formado durante a clivagem da ligação carbono-carbono, acompanhado de perda de hidrogênio. O pico em m/z 69 refere-se ao fragmento $C_5H_9^+$, resultante de clivagem alílica (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

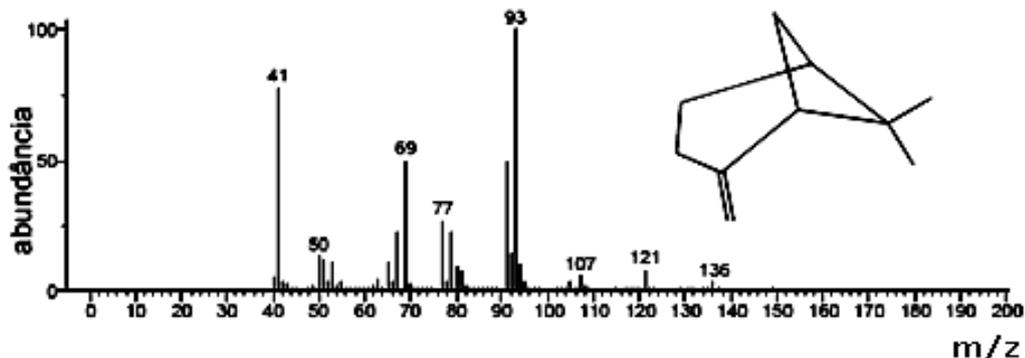


Figura 5.11 Espectro de massa do β -pineno.

A Figura 5.12 refere-se ao espectro de massa do pico 4 observado na Figura 5.6 identificado como sendo *o*-cimeno de fórmula $C_{10}H_{14}$ e massa molecular 134 g mol^{-1} (ADAMS, 2007).

Os espectros mostram um pico em m/z 134, referente ao íon molecular do *o*-cimeno, e um pico mais intenso em m/z 119 [M-15] que é atribuído à perda do grupamento metila. O pico em m/z 91 ($C_6H_5CH_2^+$) é indicativo de anel benzênico com cadeia lateral alquila, embora o íon tropílio ($C_7H_7^+$), rearranjo comum em hidrocarbonetos aromáticos, apresente também massa 91. Tal íon sofre clivagem das ligações carbono-carbono com liberação de molécula neutra de acetileno (C_2H_2) e formação do íon $C_5H_5^+$, evidenciado pela presença do pico em m/z 65. (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

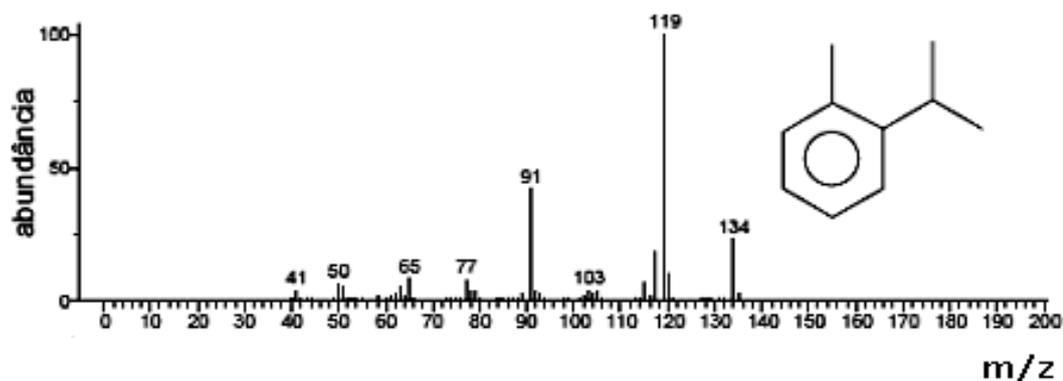


Figura 5.12 Espectro de massa do *o*-cimeno.

De acordo com o banco de dados da espectroteca e espectro de massa padrão constante na literatura (ADAMS, 2007), o pico 5 da Figura 5.6 corresponde ao limoneno, $C_{10}H_{18}$, evidenciado pela presença do íon molecular $m/z=136$ observado no espectro de massa da Figura 5.13.

O referido espectro mostra ainda o pico em m/z 121 [M-15] que é referente à perda do grupo metila, enquanto que o pico em m/z 93 pode ser decorrente da estrutura $C_7H_9^+$ que é formada por isomerização, seguida de clivagem alílica. O aparecimento do pico em m/z 67 é atribuído ao fragmento $C_5H_7^+$ resultante de clivagem alílica, enquanto que o pico em m/z 68 ($C_5H_8^+$) pode ser decorrente da quebra das ligações carbono-carbono semelhantemente à reação *retro*-Diels-alder, o qual é bastante comum em alquenos cíclicos, sendo que resulta ainda numa molécula neutra, conforme demonstrado na Figura 5.14 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

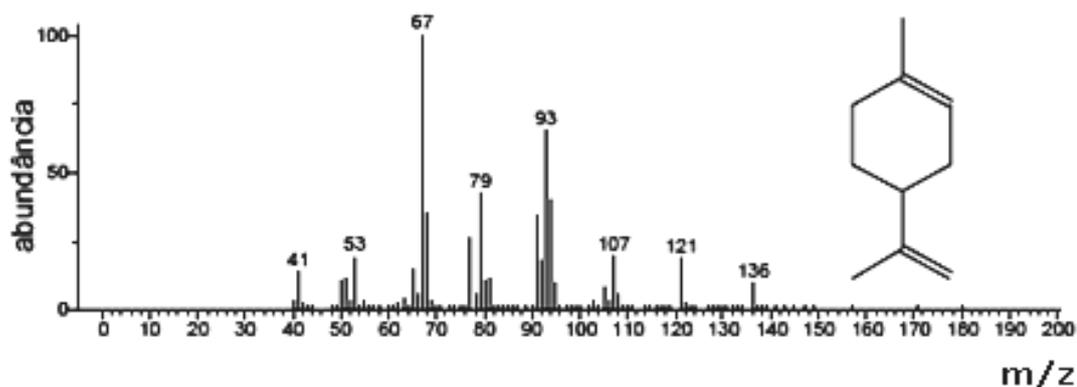


Figura 5.13 Espectro de massa do limoneno.

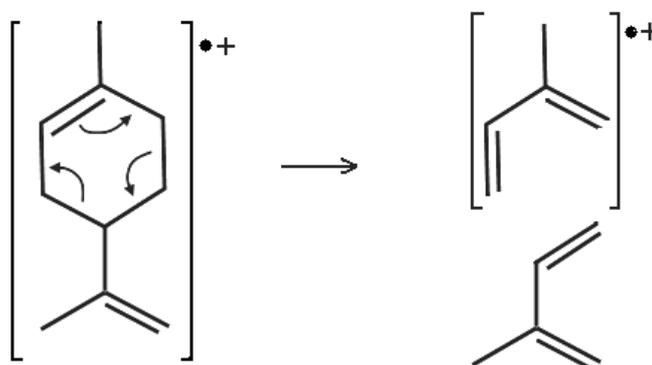


Figura 5.14 Ocorrência da reação de *retro*-Diels-Alder na fragmentação do limoneno.

O pico 9 do cromatograma da Figura 5.6 trata-se do 5-indanol, C_9H_9OH , confirmado pela presença do íon molecular m/z 134 no espectro de massa da Figura 5.15 (ADAMS, 2007).

A fácil clivagem da estrutura alifática em fenóis substituídos origina um pico mais intenso que o pico do íon molecular, o qual foi observado em m/z 133 [M-1]. Outros picos são frequentemente encontrados em compostos fenólicos como os picos $m/z=105$ [M-28] e $m/z=77$, sendo o primeiro proveniente da perda do grupo CO enquanto o segundo é atribuído à formação do íon $C_6H_5^+$. Já o pico m/z 115 [M-18] é resultante da perda de água (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

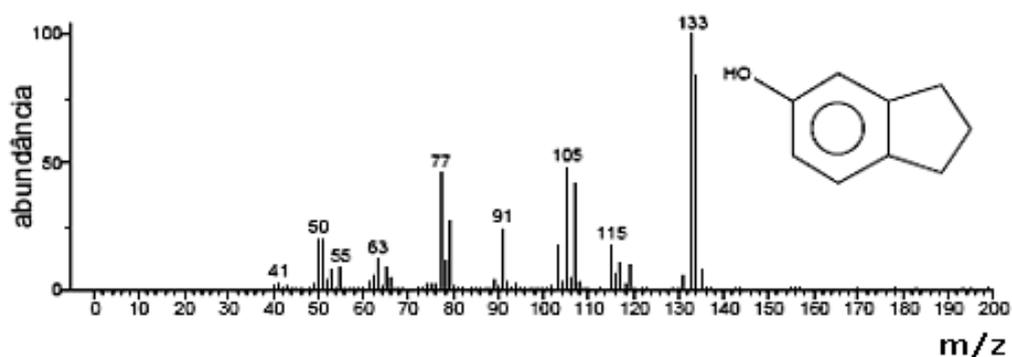


Figura 5.15 Espectro de massa do 5-indanol.

5.5 Análise por voltametria

O comportamento eletroquímico do eugenol e o seu intervalo de potencial são mostrados na Figura 5.16, os quais foram obtidos por voltametria cíclica utilizando eletrodo de carbono vítreo versus eletrodo de Ag/AgCl em solução de etanol/tampão BR pH 3,3 a 55%. Quando o eletrodo era apenas polido e uma varredura de potencial era executada (Figura 5.16A), nenhuma resposta eletroquímica era obtida na faixa trabalhada, enquanto que na presença do óleo da *Pimenta dioica* Lindl (Figura 5.16B) apareceram dois picos referentes à oxidação (524 mV) e redução (285 mV), indicando que o eugenol sofre processo redox quase reversível.

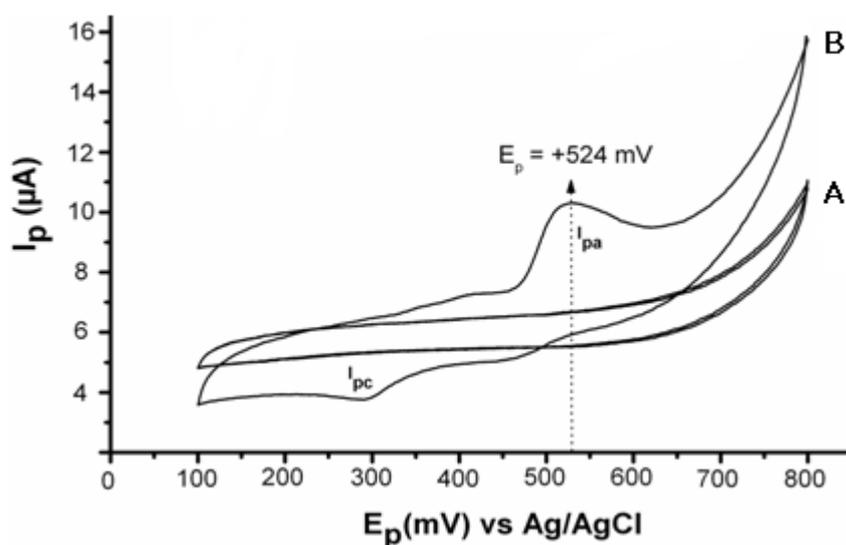


Figura 5.16 Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo (A) e do padrão de eugenol (B) registrado em eletrólito suporte (etanol/tampão BR a 55%), pH 3,3 e com velocidade de 50 mV s^{-1} .

O comportamento observado é típico de compostos fenólicos que ao ser polarizado pela ação de um campo elétrico (tal como ocorre na célula), origina compostos do tipo p-benzoquinonas (FADANELLI, 1981; YOSHIDA, 1983). A corrente de pico gerada é atribuída a um processo difusional, o qual é confirmado pela relação linear entre a corrente de pico anódico (I_{pa}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial (Figura 5.17).

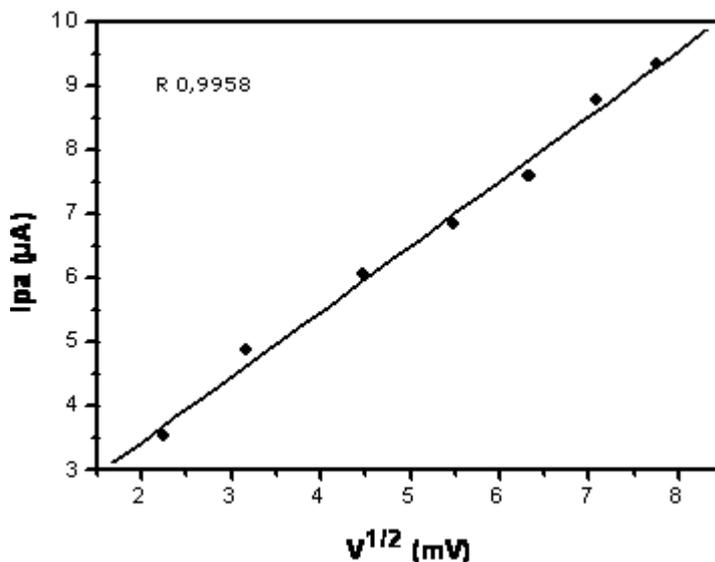


Figura 5.17 Dependência da corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial.

Segundo Vertillion e Pearl (1964), se o processo ocorrer em meio suficientemente ácido, um composto fenólico como o eugenol deverá estar completamente não ionizado e então ocorre o ataque eletrofílico no núcleo aromático da molécula com a remoção irreversível de dois elétrons, resultando no íon eugenoxônio. Uma vez que esse íon se aproxima da superfície do eletrodo é preferencialmente polarizado, cuja densidade eletrônica posiciona-se nas posições orto e para da hidroxila fenólica (Figura 5.18).

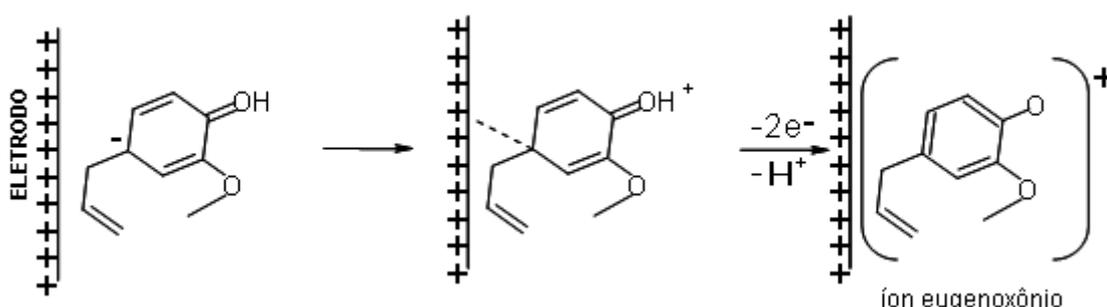


Figura 5.18 Formação do íon eugenoxônio na superfície do eletrodo de trabalho.

Vertillion e Pearl comentam ainda que se a investigação ocorrer em faixas de pH mais básicas, o composto fenólico estará totalmente ionizado devido à remoção do íon H^+ da hidroxila e o pico de oxidação representa o momento em que ocorre a reação no eletrodo com remoção de um elétron do ânion fenóxido, o que resulta no radical livre fenóxi.

No entanto, se o estudo for realizado em um meio básico onde esteja presente íons Na^+ , como é o caso do tampão BR que além do $NaClO_4$ da sua composição teve o pH ajustado com adição de $NaOH$, estes íons reagirão com a molécula de eugenol com formação do sal eugenolato de sódio, o que reduz a concentração de eugenol na solução. Tal efeito é observado na Figura 5.19 onde é mostrado a curva obtida com o estudo da dependência da corrente de pico anódico do eugenol de concentração conhecida em função do pH.

Os estudos revelaram que o eugenol origina um pico de oxidação bem definido em toda faixa de pH (1,8 a 8,8) e que os respectivos potenciais redox demonstram ser também dependente do pH, uma vez que deslocam a potenciais menos positivos com o aumento do mesmo. Nota-se ainda que o valor de pH onde se obteve maior ganho de corrente foi em 3,3, além de apresentar uma melhor definição do voltamograma sendo este, portanto, o valor de pH escolhido para as demais determinações.

Características como essas são comuns em curvas voltamétricas de substâncias orgânicas, onde tanto o potencial de pico como a altura e sua largura dependem do pH (GAYLOR *et al.*, 1953).

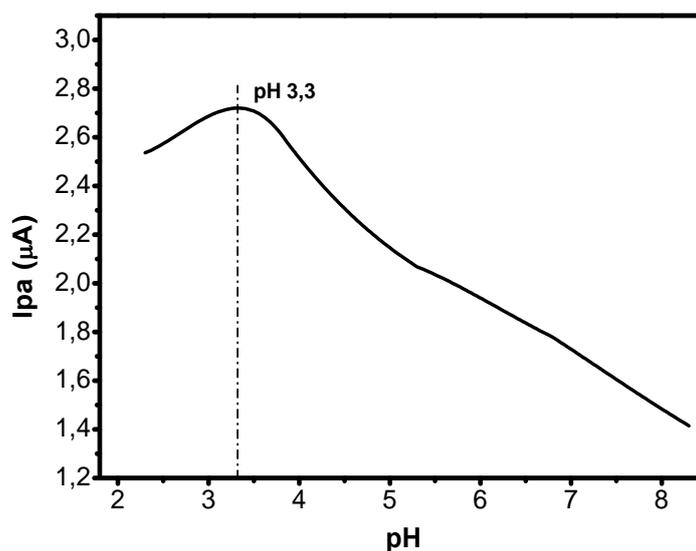


Figura 5.19 Dependência da corrente de pico anódico de $5,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do eugenol em função do pH na faixa de 2,3 a 8,8.

A quantidade de elétrons envolvida no processo redox do eugenol foi estimada através do estudo da dependência do potencial formal pelo pH (Figura 5.20), sendo que o potencial formal foi determinado pela média dos potenciais de pico anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc}). O estudo revelou um coeficiente angular de $-0,029 \text{ mV pH}^{-1}$, o qual é praticamente a metade do valor esperado teoricamente para uma meia reação eletroquímica ($-0,059 \text{ mV pH}^{-1}$) com envolvimento uma razão unitária entre prótons e elétrons (SOUSA *et al.*, 2006). Dessa forma, pode-se considerar que na reação do eugenol na superfície do eletrodo ocorra uma razão fracionada de um próton para dois elétrons.

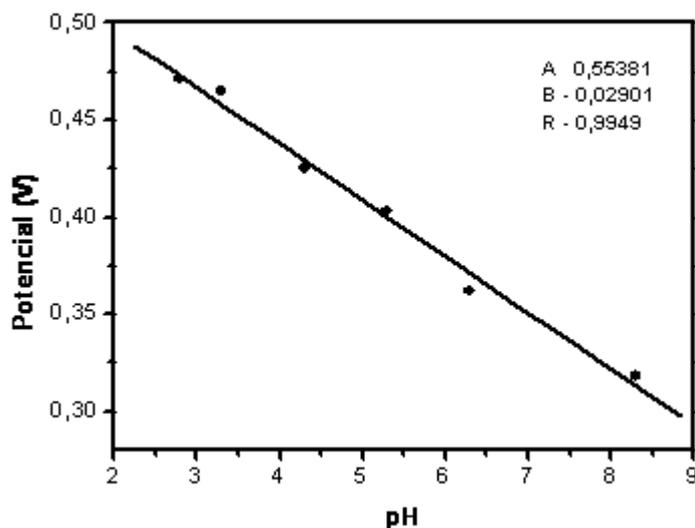


Figura 5.20 Dependência do potencial formal de $5,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do eugenol em função do pH na faixa de 2,3 a 8,8.

5.6 Quantificação do eugenol no óleo essencial

5.6.1 Determinação por UV

A Figura 5.21 mostra a dependência da absorbância do óleo em função da concentração do eugenol, o qual foi utilizado para a sua quantificação. Os espectros de absorção observados, assim com a curva de adição padrão, foram obtidos por várias concentrações de eugenol no intervalo de $1,28 \times 10^{-4}$ a $5,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de etanol/água a 60%.

A determinação quantitativa do eugenol por espectroscopia de UV foi acompanhada pelo aumento da absorção da banda do anel aromático ($\lambda_{\text{máx}}=280\text{nm}$), em função do aumento da concentração do eugenol no óleo. A curva analítica de adição padrão foi caracterizada pelo coeficiente de correlação linear igual a 0,9986 e desvio padrão de 0,039.

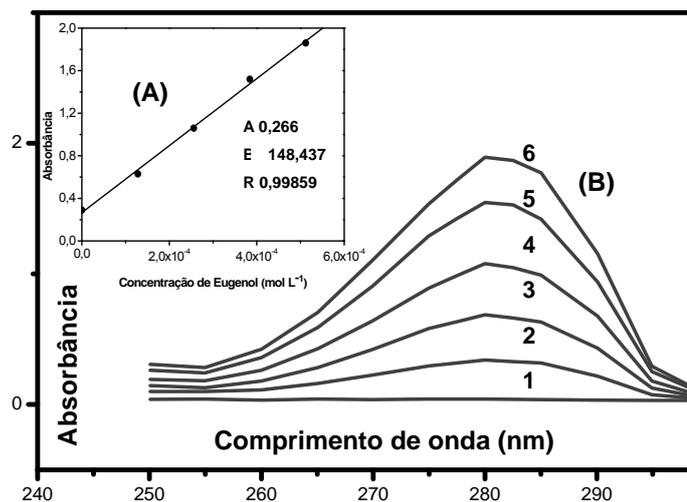


Figura 5.21 (A) Curva de adição padrão da solução estoque do padrão sobre 20 μL de solução estoque da amostra do óleo essencial em solução etanol/água a 60%; (B) Espectros de absorção da mistura etanol/água a 60% (1), da amostra (2) e das concentrações do padrão de eugenol: (3) $1,28 \times 10^{-4}$; (4) $2,56 \times 10^{-4}$; (5) $3,85 \times 10^{-4}$ e (6) $5,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Através da curva de adição padrão, levando em consideração a pureza do padrão de eugenol (98%) e às relações de diluição, pôde-se determinar, por espectrometria de UV, o teor de eugenol em 78,15% contido no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl coletado em 2006.

5.6.2 Determinação por voltametria

Devido à baixa sensibilidade analítica apresentada pela voltametria cíclica, optou-se por fazer uso da técnica de voltametria de pulso diferencial para a determinação do teor de eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl tendo-se como base os parâmetros determinados a partir da voltametria cíclica.

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos por adições sucessivas de concentrações de eugenol sobre o óleo são apresentados na

Figura 5.22. Inicialmente leu-se a corrente de 100 μ L da solução estoque da amostra (1) no eletrólito e no potencial de oxidação de 524 mV. Em seguida foram adicionados volumes pré-determinados de solução padrão de eugenol que resultou nas concentrações: $2,0 \times 10^{-5}$ (2); $4,0 \times 10^{-5}$ (3); $6,0 \times 10^{-5}$ (4); $8,0 \times 10^{-5}$ (5); $10,0 \times 10^{-5}$ (6) e $12,0 \times 10^{-5}$ (7). O tempo de deposição foi de 100 s, amplitude de pulso de 100 mV e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

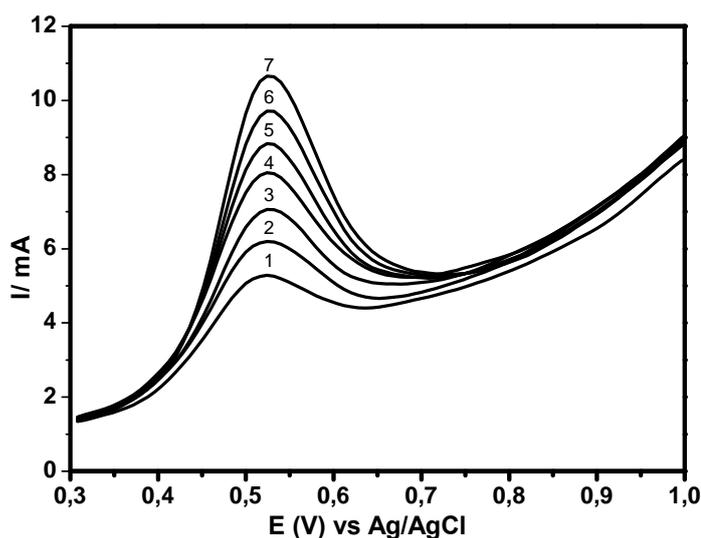


Figura 5.22 Voltamogramas de pulso diferencial da amostra (1) e do padrão de eugenol (2 a 7), obtidos em solução 55% etanol/tampão BR pH 3,3.

A concentração de eugenol no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl foi calculada a partir da curva de adição padrão (Figura 5.23) para o pico anódico. O valor da corrente lida para o óleo foi de $1,978 \times 10^{-6}$, o que resultou numa concentração inicial de eugenol na célula de $4,273 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ que ao ser levado em consideração a pureza do padrão utilizado (98%) e as devidas correlações de diluição, chegou-se a um teor de 74,63% de eugenol presente no óleo essencial.

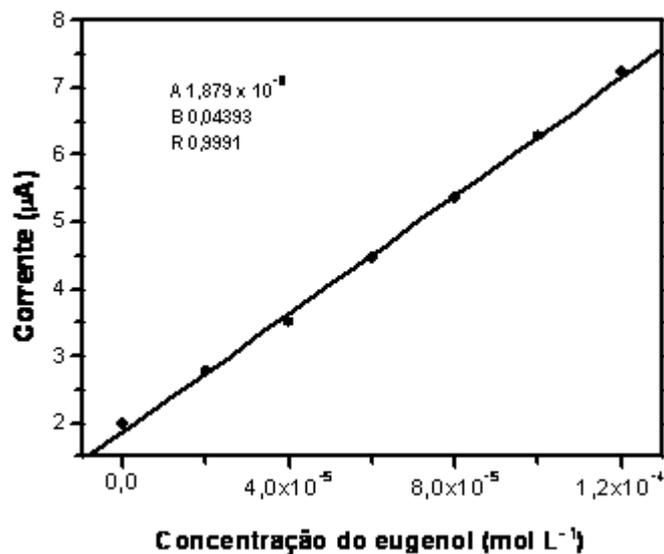


Figura 5.23 Curva da adição padrão obtida a partir do voltamograma de pulso diferencial da amostra e do padrão de eugenol em solução 55% etanol/tampão BR pH 3,3.

A partir dos resultados obtidos pelas técnicas espectrofotométricas e voltametria de diferencial de pulso, bem como os valores encontrados nos métodos de adição padrão e o fornecido na cromatografia pelo método da integração de pico, foi possível comparar e avaliar a utilização dessas técnicas aplicadas às determinações qualitativas e quantitativas do eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Comparação entre as técnicas analíticas de cromatografia, espectroscopia e voltametria de pulso diferencial para determinação quantitativa do eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl.

Técnica analítica	Método adotado	Amostra	Teor de eugenol (%)	Fator de correlação
Espectroscopia UV	Curva de adição padrão	Fruto	78,15	0,9985
Voltametria de pulso diferencial	Curva de adição padrão	Fruto	74,63	0,9991
Cromatografia gasosa	Normalização	Fruto	76,98	-

A Tabela 5.5 apresenta os valores de eugenol no óleo essencial extraído dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl variando de 74,63 a 78,15%. A comparação dos resultados obtidos por espectrofotometria e voltametria de pulso diferencial (VPD) que embora tenha resultado numa variação de 3,52%, esta é considerada aceitável para técnica analítica (CAULCUTT e BODDY, 1983), o qual pode estar associado aos desvios da metodologia ou, no caso da VPD, em perdas nas transferências de volumes e limpeza dos eletrodos envolvidos na análise. Tais resultados não se encontram tão aquém quando comparados com o obtido pela cromatografia, o que credencia o emprego de uma dessas técnicas na indústria de óleos essenciais que contenham eugenol como componente majoritário.

5.7 Susceptibilidade microbiana

A atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl pelo método da difusão em disco em relação às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera*, estão apresentadas na Tabela 5.6. Para efeito de comparação, foram realizados ainda testes de susceptibilidade de tais bactérias aos padrões de eugenol e metileugenol.

Tabela 5.6 Sensibilidade das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera* ao óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl e aos padrões de eugenol e metileugenol, utilizando-se o método de difusão em disco

Composto	BACTÉRIA*				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia odorífera</i>
Óleo essencial	21	21	20	16	13
Padrão de eugenol	19	15	15	16	11
Padrão de metileugenol	0	0	0	0	0

* halo medido em milímetro

O estudo mostrou que todas as bactérias testadas apresentaram susceptibilidade ao óleo essencial e ao padrão de eugenol, enquanto que o padrão de metileugenol teve efeito nulo.

O resultado positivo tanto do óleo como do padrão de eugenol corroboram com os estudos realizados por Novacosk e Torres (2006) quando verificaram que de cinco óleos essenciais extraídas de plantas

medicinais, os que apresentaram maior atividade antimicrobiana eram aqueles que possuíam elevados teores de álcoois, fenóis e aldeídos, bem como com aqueles obtidos por Asolini *et al.* (2006) que observaram atividade antimicrobiana de todos os compostos fenólicos extraídos de dez plantas usadas como chás.

O desempenho negativo do metileugenol frente às bactérias testadas – embora seja estruturalmente semelhante à molécula do eugenol – é atribuído ao fato de não ser um fenol, pois apresenta o radical metil no lugar do hidrogênio desse grupo.

Comparando-se os resultados da Tabela 5.6, observa-se que os halos do óleo essencial são maiores que os halos do padrão de eugenol (com exceção do obtido no teste com a *Pseudomonas aeruginosa* que foram iguais, Figura 3.24), porém próximos, indicando ser o seu componente majoritário o principal responsável pelo efeito do óleo.

Os dados mostraram que o óleo teve uma variação do diâmetro dos halos de inibição de 13 a 21 mm e que o menor halo de inibição (11 mm) foi apresentado pelo padrão de eugenol para a cepa de *Serratia odorífera*.

Segundo Alzoreky e Nakahara (2003), halos com valores menores que 12 mm não são indicativos de atividade antibacteriana. No entanto, com relação a diferentes óleos essenciais que apresentam o eugenol como componente majoritário, é quase um consenso entre os autores classificar sua eficiência como agente antibacteriano quando apresentar um halo com diâmetro mínimo entre 8 e 10 mm para testes feitos pelo método da difusão em disco (CIMANGA *et al.*, 2002; FARAGO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005). Por outro lado, como a zona de inibição de crescimento no teste de difusão é bastante influenciada pela velocidade de difusão das substâncias no ágar, o qual apresenta natureza hidrófila, e sendo o óleo essencial viscoso e de baixa polaridade, o que dificultaria a sua difusão nesse meio, então qualquer valor do halo obtido,

por menor que seja, dá suporte para classificar tal óleo como um agente de atividade antibacteriana (FONSECA *et al.*, 2006; GLISIC *et al.*, 2007).

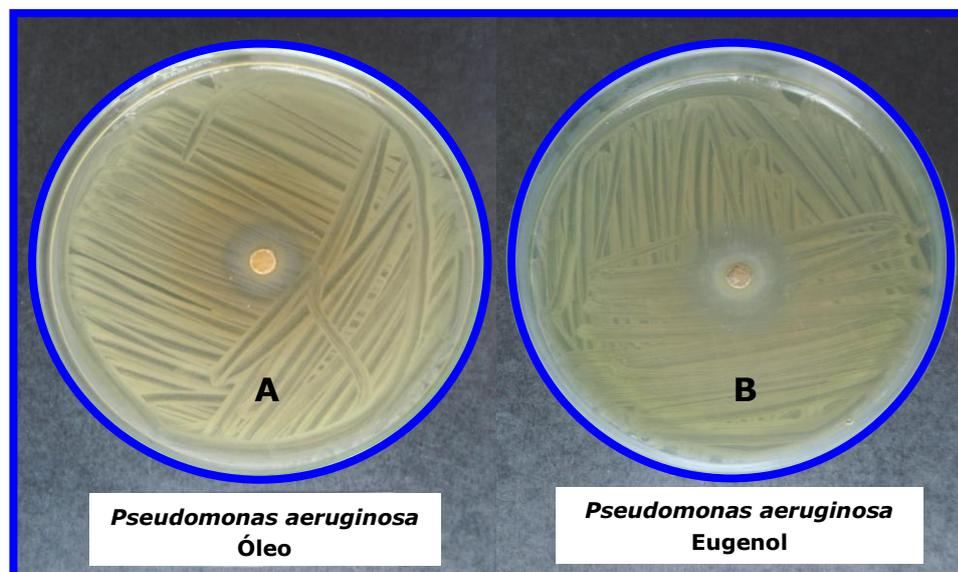


Figura 5.24 Atividade antibacteriana do óleo essencial (A) e do padrão de eugenol (B) contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

O estudo da atividade antibacteriana do padrão de eugenol frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resultou em halo de inibição superior ao encontrado por Dorman e Deans (2000) para as mesmas bactérias, as quais foram de 13,3 e 11,5 mm, e próximo ao encontrado pelos mesmos autores para a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo esta 15,5 mm.

Oussalah e colaboradores (2007) ao estudarem a atividade antimicrobiana do óleo essencial de vinte e oito espécies, inclusive da *Pimenta dioica* Lindl, frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, verificaram que todas apresentaram susceptibilidade ao óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl. Resultado semelhante foi encontrado no presente estudo para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os dados apresentados na Tabela 5.6 mostram que as bactérias citadas foram as mais susceptíveis

ao óleo, apresentando para ambas um halo de inibição de 21 mm (Figura 5.25).

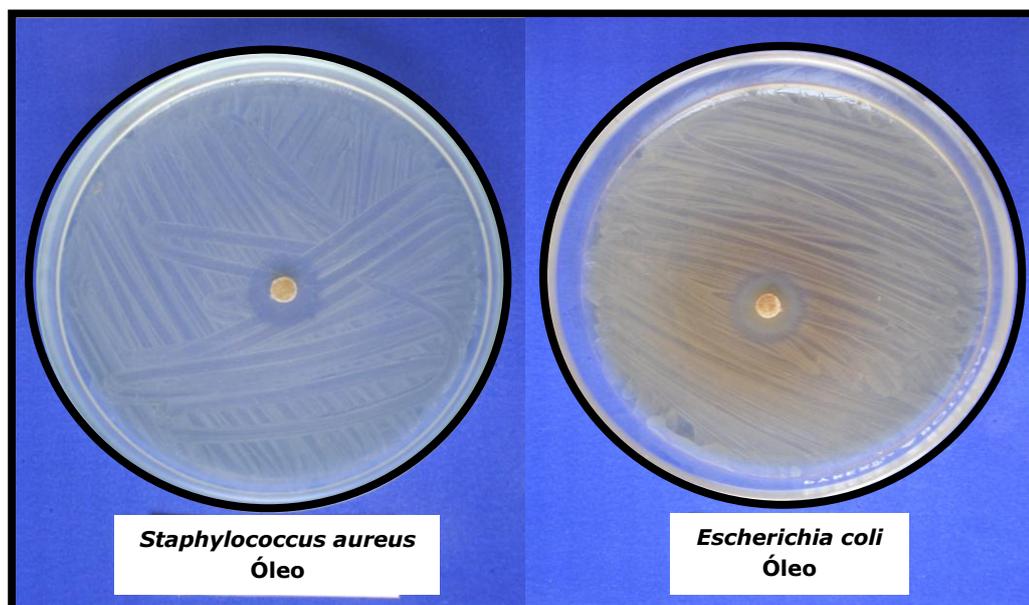


Figura 5.25 Atividade antibacteriana do óleo essencial contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Corroborando com esses resultados, os estudos realizados por Nascimento *et al.* (2007) com o óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, entre outros, frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positivo*, *Salmonella spp* e *Víbrio parahaemolyticus* isoladas do molusco sururu (*Mytella falcata*), mostraram que esse óleo foi o que apresentou melhor resultado para a *Escherichia coli* (halo de inibição com 23 mm), quando utilizando o método de difusão de disco, e o segundo melhor resultado (halo de inibição com 14 mm) para o método de difusão radial em duas camadas de ágar perfurada.

Romero *et al.* (2005) pesquisaram a atividade antimicrobiana de 23 extratos de plantas aromáticas utilizadas no sul do Texas como ervas medicinais, entre elas a pimenta da jamaica, contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*. Seus resultados mostraram que o extrato da *Pimenta dioica* Lindl inibiu o

crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, porém não demonstrou eficácia frente às bactérias gram-negativas. Nossos estudos mostraram que o óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, em comparação aos resultados citados, apresentou maior eficácia frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, bem como atividade antibacteriana contra a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa*, ambas gram-negativas, cujo halo de inibição para esta última foi de 16 mm.

O óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl apresentou ainda atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas *Proteus mirabilis* e *Serratia odorífera* (Figura 5.26), onde resultou num halo de inibição de 20 e 13 mm, respectivamente, sendo que estes foram superiores aos halos obtidos como o padrão de eugenol (Tabela 5.6)

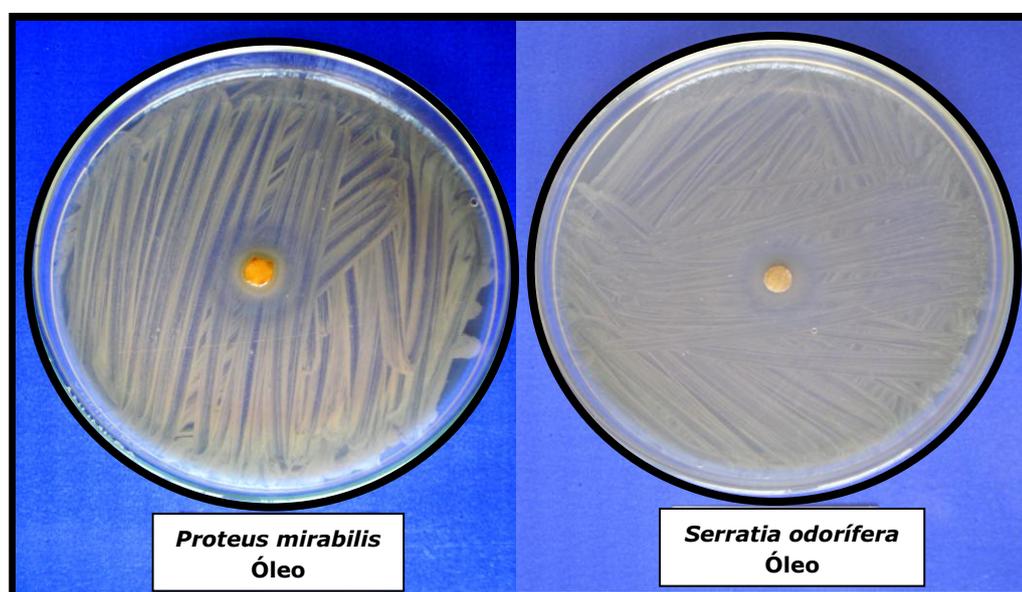


Figura 5.26 Atividade antibacteriana do óleo essencial contra as bactérias *Proteus mirabilis* e *Serratia odorífera*.

Para Cimanga e colaboradores (2002), óleos essenciais que resultem em halos de inibição de crescimento abaixo de 10 mm, são classificados como inativos, ativos se resultarem em halos entre 10 e 15 mm e muito ativo para valores acima de 15 mm. Dessa forma, pode-se

observar que o óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl apresentou atividade antibacteriana de excelente nível para quatro das cinco bactérias testadas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*), para os quais o halo de inibição foi acima de 15 mm. Para a bactéria *Serratia odorífera* o óleo apresentou um halo de 13 mm, sendo, portanto, classificado como moderadamente ativo. Os resultados mostram que todas as bactérias testadas foram mais sensíveis ao óleo essencial que a seu componente majoritário, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, onde o eugenol apresentou o mesmo desempenho do óleo.

Ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação dos óleos essenciais frente às bactérias. Algumas pesquisas, no entanto, apontam como sendo a membrana celular o primeiro ponto de ataque dos óleos essenciais e isso se deve às suas características físicas intrínsecas: apresentam componentes lipófilos e voláteis (STAMMATI *et al.*, 1999).

Para Burt (2004), essa ação conjunta dos componentes do óleo, denominado sinergismo, é que o torna eficaz como agente antibacteriano. Tal efeito justifica a maior atividade do óleo essencial frente às bactérias testadas do que o seu componente majoritário e esse ganho de eficiência são atribuídos aos demais componentes do óleo. O β -pineno, segundo maior componente do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com 6,52%, demonstrou apresentar atividade inibitória contra o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus pyogenes* (LEITE *et al.*, 2007). O limoneno (4,09%), quarto maior componente do óleo essencial, também apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*, bem como aos microrganismos *Escherichia coli* e *Candida albicans* (SCHUCK *et al.*, 2001). Dorman e Deans (2000) testaram a atividade antibacteriana do α -pineno e do linalol e concluíram que ambos apresentaram eficácia frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Tais substâncias estão também presentes no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com 0,28 e 0,64%, respectivamente.

A Tabela 5.7 apresenta a sensibilidade da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera* frente a antibacterianos tradicionalmente utilizados, os quais foram selecionados com base na literatura (CLSI, 2008b) e que serviram apenas como padrões de comparação.

Tabela 5.7 Sensibilidade das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorífera* frente a alguns antibióticos

Antibiótico	BACTÉRIA*				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia odorífera</i>
Ampicilina	16	nt	0	nt	15
Cefoxitina	23	nt	0	nt	16
Cloranfenicol	22	nt	21	13	21
Eritromicina	nt	20	nt	nt	nt
Gentamicina	nt	19	nt	15	nt
Penicilina	nt	40	nt	nt	nt
Sulfazotrim	nt	nt	nt	12	nt
Tetraciclina	16	nt	14	12	8
Vancomicina	nt	16	nt	nt	nt

* halo medido em milímetro; nt, não foi testado.

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi a que se mostrou ser mais facilmente eliminada, sendo sensível a três dos antibióticos testados (vancomicina, gentamicina e penicilina) e moderadamente sensível para a

eritromicina (Apêndice B). Com um halo de inibição de 21 mm, o óleo essencial apresentou um desempenho melhor que o obtido por três desses antibióticos, ficando atrás apenas da penicilina que resultou num halo de 40 mm.

Já *Proteus mirabilis* apresentou resistência aos antibióticos ampicilina, cefoxitina e tetraciclina, porém sensível à clorafenicol (Apêndice B), sendo que resultou em halo nulo frente aos dois primeiros. Comparando-se ao óleo essencial (halo igual a 20 mm), este apresentou um desempenho superior a três dos antibióticos e resposta próxima ao obtido pelo cloranfenicol.

A *Eschirichia coli* foi sensível aos antibióticos cefoxitina e cloranfenicol e moderadamente sensível à ampicilina e tetraciclina (Apêndice B), os quais apresentaram halo de inibição variando de 16 a 23 mm. O resultado obtido com o óleo essencial para essa mesma bactéria foi superior ao atingido pela ampicilina e tetraciclina, ficando muito próximo do resultado obtido pelos demais antibióticos.

Tanto a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* como a *Serratia odorífera* tiveram um comportamento semelhante frente aos respectivos antibióticos testados. A primeira foi sensível à gentamicina, moderadamente sensível ao clorafenicol e sulfazotrim, sendo resistente à tetraciclina. A *Serratia odorífera* mostrou também resistência à tetraciclina, porém sensível ao clorafenicol e moderadamente sensível à ampicilina e cefoxitina. Comparando-se estes resultados com os obtidos pelo óleo às mesmas bactérias, nota-se que aquele originado frente à *Pseudomonas aeruginosa* (halo igual a 16 mm) foi superior aos obtidos pelos antibióticos correspondentes. No entanto, a susceptibilidade da *Serratia odorífera* ao óleo essencial resultou num halo de inibição de 13 mm, cujo valor só foi maior que o obtido no teste para esta bactéria com a tetraciclina, porém próximo ao resultado do teste com a ampicilina e cefoxitina.

Tais resultados são compatíveis aos encontrados por Gonçalves e colaboradores (2008), os quais avaliaram a susceptibilidade das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, isoladas de crustáceos, frente a alguns antibióticos. Os autores verificaram que a *Escherichia coli* se mostrou sensível à vancomicina, porém não apresentou susceptibilidade ao antibiótico tetraciclina. Observaram ainda que *Staphylococcus aureus* foi sensível à vancomicina, bem como à cefoxitina e clorafenicol,

Resultado semelhante foi obtido por Nascimento *et al.* (2007) quando avaliaram a susceptibilidade dessas bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), oriundas de moluscos, aos antibióticos clorafenicol, tetraciclina, cefoxitina, vancomicina, eritromicina e ampicilina. Seus resultados divergem com o nosso apenas no obtido com a tetraciclina, onde constataram que a bactéria *Escherichia coli* se mostrou resistente a esse antibiótico.

Os resultados do presente trabalho são também compatíveis com aqueles obtidos por Fernández-Delgado e colaboradores (2007). Os autores testaram 12 antimicrobianos comerciais frente à bactéria *Proteus mirabilis* isolada de ostras da costa Venezuelana e verificaram que a mesma apresentou resistência à maioria dos antibióticos testados, entre eles à ampicilina, cefoxitina e tetraciclina. Kolar *et al.* (2005) testaram a susceptibilidade da bactéria *Proteus mirabilis* oriunda de aves frente a 18 antibióticos e também observaram a sua resistência à tetraciclina.

Resultados também concordantes foram relatados por Gonçalves *et al.* (2005). Os autores avaliaram a atividade antimicrobiana de fonte natural frente a 10 bactérias patogênicas e verificaram que *Proteus mirabilis* também foi resistente a ampicilina e tetraciclina. A pesquisa revelou também que a *Escherichia coli* foi sensível a gentamicina, porém resistente a ampicilina. Concluíram ainda que *Staphylococcus aureus* foi sensível a vancomicina e que a *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível a gentamicina, no entanto se mostrou resistente a clorafenicol e sulfazotrim.

Corroborando também com nossos resultados, cita-se o estudo realizado por Stock e colaboradores (2003). Estes autores testaram a susceptibilidade antimicrobiana de cepas da espécie *Serratia*, entre elas a *Serratia odorífera*, com vários antibióticos e constataram que tanto essa espécie como a *Serratia* foram as menos sensíveis à tetraciclina, estreptomicina e espectinomicina, resultando em resistência natural à tetraciclina e cloranfenicol para todas as estirpes.

A resistência da *Pseudomonas aeruginosa* à tetraciclina é atribuída ao fato desse antibiótico ser bacteriostático (somente inibe o crescimento) e à sua capacidade de se agrupar formando colônias unidas por uma matriz de exopolissacarídeo que resulta numa espécie de blindagem. Além disso, são capazes ainda de produzir β -lactamase (PICÃO e GALES, 2007).

Observa-se com este trabalho a forte tendência do uso de óleos essenciais como agente antimicrobiano. Daferera (2003) comenta que isso se deve a dois principais fatores: o primeiro é o fato dos óleos essenciais serem provenientes de fontes naturais que, a princípio, não constituem riscos à saúde e ao ambiente; o segundo, que seria o mais importante, acredita-se que devido à complexa constituição dos óleos essenciais, o risco de um microrganismo adquirir resistência seria praticamente nulo, uma vez que tais constituintes podem atribuir ao óleo diferentes formas de ação. Esse último é mais acentuado se levarmos em conta que a sua composição é influenciado pela região, clima, partes da planta de onde tenha sido extraído, entre outros (SIMÕES e SPITZER, 2003).

Entretanto, outras pesquisas são necessárias para obtenção de mais informações sobre a aplicação dos óleos essenciais como agentes antibacterianos em alimentos e na medicina. Espera-se que o presente trabalho dê suporte à aplicação do óleo essencial dos frutos da espécie vegetal *Pimenta dioica* Lindl como agente antibacteriano no controle dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPÍTULO 6

6 CONCLUSÃO

1. O estudo de extração do óleo essencial permitiu determinar a melhor relação entre biomassa e quantidade de água que propiciasse um maior rendimento em função do tempo, o que possibilitou um rendimento de 2,16% (m/m). Tal rendimento foi considerado elevado quando comparado com o rendimento na extração de outros óleos essenciais, inclusive o da *Pimenta dioica* Lindl;
2. Os estudos das propriedades físico-químicas do óleo essencial apresentaram valores semelhantes aos valores obtidos pela literatura, confirmando que os mesmos podem ser utilizados na sua identificação e no controle de qualidade;
3. Por meio das técnicas espectroscópicas no UV e IV, bem como por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13, foi possível identificar o eugenol como constituinte do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl, o qual foi confirmado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
4. A caracterização por CG-EM possibilitou ainda a identificação e quantificação de dezesseis outros componentes do óleo, sendo que o eugenol é o componente majoritário com 76,98%, calculado pelo método de normalização;
5. Pela técnica espectroscópica de UV foi possível a quantificação do eugenol no óleo essencial pelo método da adição padrão, o qual apresentou um teor de 78,15%;
6. O presente estudo também demonstrou a potencialidade da utilização das técnicas eletroanalíticas de voltametria cíclica e da voltametria de pulso diferencial na caracterização eletroquímica do eugenol com emprego de eletrodo de carbono vítreo, bem como a viabilidade da

aplicação na determinação quantitativa de compostos fenólicos, como o eugenol, cujo teor determinado foi de 74,63%.

7. A partir dos resultados obtidos para a caracterização e quantificação do eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl pelas técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial, novas metodologias poderão ser desenvolvidas a outros tipos de óleos essenciais, levando-se em consideração as características inerentes do analito de interesse.
8. Através do método de difusão em disco verificou-se que, a exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, todas as bactérias testadas foram mais sensíveis ao óleo essencial dos frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl do que ao seu componente majoritário, o eugenol. Isso se deve à contribuição sinérgica dos demais componentes presentes no óleo, como o β -pineno e o limoneno;
9. Os resultados mostraram ainda que o óleo essencial apresentou, no geral, uma atividade antibacteriana melhor do que o antibiótico específico à respectiva bactéria testada.

CAPIÍTULO 7

7 REFERÊNCIAS

ABENA, A. A.; DIATEWAA, M.; GAKOSSOA, G.; GBEASSORC, M.; HONDI-ASSAHA, TH.; OUAMBA, J. M. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia*, **74(3): 231, 2003**.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2ª ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4ª ed. Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Corporation, 2007.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processo de eletrodo. *Quím. Nova*, **27(5): 813, 2004**.

ALZOREKY, N.S; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Inter. J. Food Microbiology*, **80(3): 223, 2003**.

ANDRADE, L. S.; ROCHA FILHO, R. C. BOCCHI, N. BIAGGIO, S. R. Estudo de efeito dos sais precursores sobre as propriedades eletrocatalíticas de eletrodos de Ti-SnO₂/Sb preparados por decomposição térmica. *Quim. Nova*, **27(6): 866, 2004**.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/registro_fitoterapicos.pdf>. Acessado em março/2008.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Braz. J. Food Technol.*, **9(3): 209, 2006.**

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. ***Escherichia coli***: una aproximacion práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza-España: Acribia, 243p., 2000.

BOJENSEN. Essential oils. Disponível em: <<http://www.bojensen.net/EssentialOilsEng/EssentialOils01/EssentiaOils01.htm#Allspice>>. Acessado em 08 out 2008.

BUFFLE, J.; TEECIER-WAEBER, M-L. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. *Trends in Analytical Chemistry*, **24(3): 172, 2005.**

BUHR, K.; RUTH, S. V.; DELAHUNTY, C. Analysis of volatile flavour compounds by proton transfer reaction-mass spectrometry: fragmentation patterns and discrimination between isobaric and isomeric compounds. *Int. J. Mass Spectrom.*, **221: 1, 2002.**

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microb.*, **94(3): 223, 2004.**

CARDOSO, J. L. *Desenvolvimento de sistemas portáteis de monitoramento eletroquímico*. São Paulo, Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, USP. Dissertação de Mestrado, 146p., 2007.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistics for analytical chemists**. 1ª ed. London: Chapman & Hall, 253p., 1983.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Campaign to prevent antimicrobial resistance in healthcare settings. Why a Campaign?.

Dezembro, 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/healthcare/problem.htm>>.

Acessado em: 15 de junho 2008.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethno-pharmacology*, **79 (2): 213, 2002.**

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard.** 3ª ed. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 99p., 2008a.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo. ANVISA, 2008b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_teste_sensibilidade.pdf>. Acessado em: 11 novembro 2008.

CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; NAKAMURA, C. V. Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L. (LABIATAE). *Arq. Ciênc. Saúde*, **2(2): 125, 1998.**

COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M. e FARIAS, M. A. A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, **2(2): 11, 2008.**

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L. SANTOS, N. K. A.; CARDOS, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Rev. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, Lippia

sidoides e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacognosia*, **15(4): 304, 2005**.

COSTA SOBRINHO, J. R. S. *Estudo analítico e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas da Pimenta dióica L.* São Luís, Pós-Graduação de Química Analítica, UFMA. Dissertação de Mestrado, 84p., 2007.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, **22(1): 39, 2003**.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. *Quim. Nova*, **28(4): 642, 2005**.

DAVID, F.; SCANLAN, F.; SANDRA, P.; SZELEWSKI, M. Analysis of essential oil compounds using retention time locked methods and retention time databases. Agilent Technologies, maio 2002. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-6530EN.pdf>>. Acessado em março 2009.

DÍAZ, L. H.; JORGE, M. R.; GARCIA, D.; ALEA, J. P. Actividad antidermatofítica in vitro de aceites esenciales. *Rev Cubana Plant Med.*, **8(2): 2003**.

DIÓGENES, M. J. N.; MATOS, F. J. A. Dermatite de contato por plantas (DCP). *An. Bras. Dermatol*, **74(6): 629, 1999**.

Di STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESP. 230p., 1996.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Applied Microbiology*, **88: 308, 2000.**

DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SULLIVAN, M.G.O.; GUILLETA, A.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* sp., on Irish retail meat products. *Food Microbiology*, **16: 623, 1999.**

DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; DUCCELLIER, J. **Handbook of Medicinal Spices.** 2ª ed. Florida: ORC, p. 245., 2002.

EHLERT, P. A. D.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; PAULA, J. W. A.; CAMPOS, D. A.; ALVIANO, C. S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essenciais de sete espécies de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, **8(2): 79, 2006.**

FADANELLI, E. Voltametria dos compostos fenólicos. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP. Dissertação de Mestrado, 66p., 1981.

FARAGO, P. V.; PAULA, J. P.; BITTENCOURT, J. M.; ZARPELLON, V.; CHECCHIA, L. E. M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* benth. (Lamiaceae). *Cien. Biol. Saúde, Ponta Grossa*, **10 (3/4): 59, 2004.**

FARIAS, M. R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais.** In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3ª ed. Florianópolis: UFSC, p. 199-222, 2001.

FEI, J.; LUO, L.; HU, S.; GAO, Z. Amperometric determination of ascorbic acid at electrodeposited redox polymer film modified gold electrode. *Eletroanalysis*, **16(4): 319, 2004.**

FEITOSA, E. M. A.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, C. F.; VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; MALCHER, G. T.; NASCIMENTO, R. F.; BRAZ-FILHO, R. Chemical composition and larvicidal activity of *rollinia leptopetala* (Annonaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, **20(2): S1, 2009**.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; CONTRERAS, M.; GARCÍA-AMADO, M. A.; GUENEAU, P.; SUÁREZ, P. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **49(6): 355, 2007**.

FERREIRA, R. R.; DAMY, S. B.; REIS, A. M.; TOLOSA, E. M. C. Isolamento de *Proteus* de lavado tráqueo-bronquial de camundongos. Controle de Contaminação, julho 2008. Disponível em: <<http://www.nteditorial.com.br/revista/Materias/?RevistaID1=2&Edicao=72&id=732>>. Acessado em: 02 nov 2008.

FONSECA, E. N.; FIGER, A.; FURTADO, D. T.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Análise química e atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Vitex cymosa* Bertero. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, **8(4): 87, 2006**.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424p., 2002.

FRANCISCO, M. S. P.; CARDOSO, W. S.; KUBOTA, L. T.; GUSHIKEM, Y. Electrocatalytic oxidation of phenolic compounds using an electrode modified with Ni(II) porphyrin adsorbed on SiO₂/Nb₂O₅-phosphate synthesized by the sol-gel method. *J. Electroanal. Chem.*, **602(1): 29, 2007**.

GAYLOR, V. F., ELVING, P. J.; CONRAD, A. L. Polarographic oxidation of phenolic compounds. *Anal. Chem.*, **25(7): 1078, 1953**.

GLISIC, S. B.; MILOJEVI, S. Z.; DIMITRIJEVIC, S. I.; ORLOVIC, A. M.; SKALA, D. U. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. *J. Serb. Chem. Soc.*, **72(4): 311, 2007.**

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **72(4): 455, 2005.**

GONÇALVES, F. A.; ANDRADE NETO, M.; N. S. BEZERRA, J. N. S.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V.; FONTELES-FILHO, A. A.; VIEIRA, R. H. S. F. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GUAVA, *Psidium guajava* LINNAEUS, LEAF EXTRACTS ON DIARRHEA-CAUSING ENTERIC BACTERIA ISOLATED FROM SEABOB SHRIMP, *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **50(1):11, 2008.**

GONZÁLEZ DE COSÍO, M. Especies vegetales de importancia económica en México. México: Porrúa, 305 p., 1984.

GUIMARÃES, P. I. C.; OLIVEIRA, R. E. C.; ABREU, R. G. Extraíndo óleos essenciais de plantas. *Quim. Nova na Escola*, **11: 45, 2000.**

HEJAZIAN, S. H. Analgesic Effect of Essential Oil (EO) from *Carum Copticum* in Mice. *World J. of Medical Sciences*, **1(2): 95, 2006.**

HOEFLER, R.; VIDOTTI, C. C. F.; MENEZES, E. S.; PINHEIRO, S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. *Boletim Farmacoterapêutica*, **ano XI(4): 1, 2006.**

HOLLEY, R.A; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, **22: 273, 2005.**

ISO 4729. Oil of pimento leaf (*Pimenta dioica* (Linnaeus) Merrill). International Organization for Standardization, 1984. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_tcBrowse.htm?commid=48956>. Acessado em 5 out 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 712p, 2005.

KIKUZAKI, H.; HARA, S.; KAWAI, Y.; NAKATANI, N. Antioxidative phenylpropanoids from berries of *Pimenta dioica*. *Phytochemistry*, **52 (7): 1307, 1999**.

KIKUZAKI, H.; SATO, A.; MAYAHARA, Y.; NAKATANI, N. Galloylglucosides from Berries of *Pimenta dioica*. *J. Nat. Prod.*, **63(6): 749, 2000**.

KOLAR, M.; BARDON, J.; SAUER, P.; KESSELOVÁ, M.; CEKANOVÁ, L.; VÁGNEROVÁ, I.; KOUKALOVÁ, D.; HEJNAR, P. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* in poultry of Middle Moravia, Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, **74: 249, 2005**.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, **49(4): 508-536, 1997**.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Braz. J. Pharm. Sciences*, **43(1): 121, 2007**.

LIMA, C. A. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P. A.; Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **20(3): 358, 2000.**

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, S. M.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amaz.*, **35(3): 363, 2005.**

LÓPEZ, A. B.; CAPÓ, J. T.; GONZÁLEZ, Y. C. Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de *Pimenta dioica* L. y evaluación de su toxicidad aguda oral. *Rev. Cubana Farm.*, **32(3): 198, 1998.**

LOUREIRO, M. M.; DE MORAES, B. A.; MENDONÇA, V. L. F.; QUADRA, M. R. R.; PINHEIRO, Q. S.; ASENSI, M. D. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97(3): 387, 2002.**

MARINHO, S. C. *Caracterização química e avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais das espécies Pimenta dioica Lindl, Aniba duckei Kostermans e Zingiber officinale Roscoe.* São Luís, Pós-Graduação em Química Analítica, UFMA. Dissertação de Mestrado, 111p., 2005.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Differences in Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian Cultivars Related to Morphological Characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **44: 3926, 2005.**

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais.** Viçosa: Editora UFV, 220p., 2003.

MARTINS, E. R.; SANTOS, R. H. S. **Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo**. Viçosa: Editora UFV, 26p. 1995.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Rev. Bras. Bot.*, **26(2): 231, 2003**.

MELO, R. C. A. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas. *Rev. Eletrônica*, **2(2): 193, 2005**.

MINOTT, D. A.; BROWN, H. A. Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dioica* (L.) Merr. Trees Based on Composition of Leaf Volatiles. *J. of Essential Oil Research: JEOR*, Jul 2007. Disponível em: <http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_/ai_n19434097>. Acessado em: 10 outubro 2008.

MITCHELL, P. J.; HAMPSON, N. A.; McNEIL, A. J. S. Adsorption at solid electrodes. 1985. Disponível em: <<http://www.rsc.org/ebooks/archive/free/EY9780851860879/EY9780851860879-00001.pdf>>. Acessado em: 25 outubro 2008.

MONTEIRO, O. S. *Estudo analítico do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como agente bactericida*. São Luís, Pós-Graduação em Química Analítica, UFMA. Dissertação de Mestrado, 100p., 2004.

MONTEIRO, O. S. *Caracterização do óleo essencial da Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB. Tese de Doutorado, 126p., 2008

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de

óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. *Quím. Nova*, **29(5): 907, 2006.**

MOUCHREK FILHO, V. E. *Eletrodo de grafite pirolítico quimicamente modificado por vermelho de alizarina S: estudos voltamétricos e aplicação analítica*. São Carlos, Pós-Graduação em Química, IQSC, USP. Tese de Doutorado, 102p., 1997.

MOUCHREK FILHO, V. E. *Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl.* São Carlos, Pós-Graduação em Química, IQSC, USP. Tese de Doutorado, 124p., 2000.

MOREIRA, L. B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. *Rev. da AMRIGS*, **48(2): 73, 2004.**

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; DEL VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of Essentials oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, **38: 565, 2005.**

MS-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surto de doença diarréica aguda em municípios do Estado do Amazonas. s/m, 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_amazonas_2511.pdf>. Acessado em 03 novembro 2008.

MYINT, S.; DAUD, W. R. W.; MOHAMAD, A. B.; DADHUM, A. A. Temperature-dependent diffusion coefficient of soluble substances during ethanol extraction of clove. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **73: 603, 1996.**

NASCIMENTO, I. B.; INNECCO, R.; MATOS, S. H.; BORGES, N. S. S.; MARCO, C. A. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de Capim-Santo (*Andropogum* sp). *Rev. Caatinga*, **19 (2): 123, 2006.**

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONILLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M. TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, **17(3): 108, 2007.**

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). *Rev. Analytica*, **21: 2006.**

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev. Eletrônica de Enferm.* **10(1): 189, 2008.**

OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, F. F.; SACRAMENTO, C. K. Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. *Bahia Agríc.*, **8(1): 46, 2007.**

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **18: 414, 2007.**

OXENHAM, S. K.; SVOBODA, K. P.; WALTERS, D. R. Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilium*). *J. Phytoapathology*, **53: 174, 2005.**

PASKOVATY, A.; PFLOMM, J. M.; MYKE, N.; SEO, S. K. A multidisciplinary approach to antimicrobial stewardship: evolution into the 21st century. *Int. J. Antimicrob Agent*, **25(1): 1, 2005.**

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **27(3): 624, 2007**.

PICÃO, R. C.; GALES, A. C. β -Lactamases de espectro ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: pesadelo ou só imaginação?. *Prática Hospitalar*, ano **IX(49): 79, 2007**.

POVH, N. P.; GARCIA, C. A.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) by steam distillation and extration with organic solvents: a process design approach. *Rev. Bras. PL. Med.*, **4 (1): 1, 2001**.

RAMONI, R.; VINCENT, F.; GROLLI, S.; CONTI, V.; MALOSSEI, C.; BOYERI, F. O.-D.; MEILLOURI, P. N.-L.; SPINELLI, S.; CABBILLAU, C.; TEGONI, M. The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein. *J. Biological Chem.*, **276(10): 7150, 2001**.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 906p., 2001.

RODRÍGUEZ, M.; GARCIA, D.; GARCIA, M.; PINO, J.; HERNANDEZ, L. Antimicrobial activity of *Pimenta dioica*. *Alimentaria* (Madrid), **274 : 107, 1996**.

RODRÍGUEZ, M. G-Q.; SARRÍA, F. B.; VALCÁRCEL, A. C.; SALVADÓ, A. C. Uso de la crema repelente de *Pimenta dioica* por combatientes de una unidad militar. *Rev. Cubana Med. Milit.*, **26(2): 94, 1997**.

ROMERO, C. D.; CHOPIN, S. F.; BUCK, G.; MARTINEZ, E.; GARCIA, M.; BIXBY, L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *J. Ethnopharmacology*, **99: 253, 2005**.

SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas. 1ª ed. Caxias do Sul: EDUCS. v. 1. 112 p., 2003.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado Técnico – MAPA, novembro 2004. Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online/comunicado-tecnico/2004/descricao-de-sistema-e-de-metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais-e-determinacao-de-umidade-de-biomassa-em-laboratorio-com-tec-99>. Acessado em 30 setembro 2008.

SANTOS, A. S.; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A. M. S.; D'AVILA, I. A. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **8(4): 14, 2006.**

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia. ***Pseudomonas aeruginosa***: Um patógeno ubíquo. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-KOOGAN, 2002.

SCHUCK, V. J. A.; FRATINI, M.; RAUBER, C. S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E. E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, **37(1): 45, 2001.**

SILVA, A. F.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, E. A. M.; CASLI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, (Lamiaceae). *Rev. Bras. Pla. Med.*, **6: 1, 2003.**

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 460p. , 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 490p., 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C. M.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap. 18, p.467-495, 2003.

SINGH, A.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; SINGH, N. A. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **36(8): 787, 2003**.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira, 1124p., 2005.

SMITH, R. M. **Understanding mass spectra: a basic approach**. 2ª ed. USA: Wiley-Interscience, p.185-186, 2004.

SOFIA, S. H.; SUZUKI, K. M. Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil. *Neotropical Entomology*, **33(6): 693, 2004**.

SOUSA, E. R.; MARQUES, E. P.; FERNANDES, E. N.; ZHANG, J.; MARQUES, A. L. B. Graphite electrodes modified by 8-hydroxyquinolines and its application for the determination of copper in trace levels. *J. Braz. Chem. Soc.*, **17(1): 177, 2006**.

SOUSA, M. C. *Estudos analíticos do óleo essencial dos frutos da espécie Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como atrativo de insetos (feromônio)*. São Luís, Pós-Graduação em Química Analítica, UFMA, 2003. Dissertação de Mestrado 99p., 2003.

SOUZA, K. S.; CHAAR, J. S.; OLIVEIRA, K. M. T.; GOMES, E. O.; PORTELA, C. N.; POHLIT, A. M.; QUIGNARD, E. L. J.; NUNOMURAS, S. M.;

TADEI, W. P.; MOUCHREK FILHO, V. E.; SILVA, D. D.; GALHIANE, M. S.; CHIERICE, G. O. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleo voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **9(2): 1, 2007**.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. *Quím. Nova*, **20(2): 191, 1997**.

STAMMATI, A. L.; BONSI, P.; ZUCCO, M. F.; MOEZELAAR, R.; ALAKOMI, H. VON WRIGHT, A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food chem. Toxicol.*, **37: 813, 1999**.

STOCK, I.; BURAK, S.; SHERWOOD, K. J.; GRÜGER, T.; WIEDEMANN, B. Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, **51: 865, 2003**.

SUÁREZ, A.; ULATE, G.; CICCIO, J. F. Cardiovascular effects of ethanolic and aqueous extracts of *Pimenta dioica* in Sprague-Dawley rats. *J. Ethnopharmacol.*, **55(2): 107, 1997**.

SUÁREZ, A.; ULATE, G.; CICCIO, J. F. Hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* (Myrtaceae) in rats. *Rev. Biol. Trop.*, **48(1): 53, 2000**.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

TAVEIRA, N.; NASCIMENTO, T.; GOMES, P.; OLIVEIRA, A. 2004. **Manual prático de microbiologia**. Caparica, Lisboa: Instituto Superior de Ciências da Saúde-Sul, Cap. 5, p.49, 2004.

TELES, R. M. *Caracterização química, avaliação térmica e atividade larvicida frente ao Aedes aegypti do óleo essencial da Aniba duckei*

Kostermans. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB. Tese de Doutorado, 120p., 2009

TRABBOLD, B. Extração de óleos essenciais. Serviço Brasileiro de Resposta Técnica - SBRT, ago 2008. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/resposta.do?acao=visualizarRTParcial&id=12055>>. Acessado em 02 set 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 718p., 2004.

UGAZ, O. L. **Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales**. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia de la Universidade Católica del Peru, p.23-42, 1994.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev. Bras. de Farmacogn.*, **18(2): 308, 2008**.

VERTILLION, F. J.; PEARL, I. A. Anodic reactions of simple phenolic compounds. *J. Electrochem. Society*, **111: 1392, 1964**.

VIDAL, L. V. O.; FURUYA, W. M.; GRACIANO, T. S.; SCHAMBER, C. R.; SILVA, L. C. R.; SANTOS, L. D.; SOUZA, S. R. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, **8(4): 335, 2007**.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. *Documentos Florestais*, **17: 1, 2003**.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 488p, 2002.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. **Manual of the flowering plants of Hawai'i**. 2^o vol. Honolulu, EUA: University of Hawaii Press and Bishop Museum Press, 1919p, 1997.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3^a ed. New York: Wiley-VCH, 272p, 2006.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; THEFELD, K.; SUBBA, G. C. Constituents of the essential oil from the rhizomes of *Hedychium gardnerianum* Roscoe. *Flavour and Fragrance Journal*, **13(6): 377, 1999**.

WIKIMEDIA. Pimenta dioica. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Pimenta_dioica,_flowers.jpg>. Acessado em: 08 out 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Microbial aspects. In: Guidelines for drinking water, Geneva: WHO, p. 130-188, 2003.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). WHO, maio 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>>. Acessado em: 02 nov 2008.

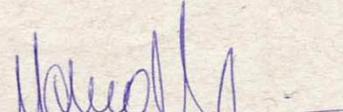
YOSHIDA, K. **Electrooxidation in organic chemistry: The role of cation radicals as synthetic intermediates**. New York: John Wiley & Sons Inc, p.202-205, 1983.

ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *J. Supercritical Fluids*, **24 (1), 57, 2002**.

ZECCONI, A.; HAHN, G. Staphylococcus aureus in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF*, **345: 15, 2000**.

APÊNDICE

Apêndice A. Certificação da espécie *Pimenta dióica* Lindl emitido pelo IBD.

		
<p>Rua Prudente de Moraes, 530 - Cep 18602-060 - Botucatu - SP Fone / Fax: + 55 (0) 14 3882 5066 ibd@ibd.com.br - www.ibd.com.br</p>		<p>Marca para produtos d Agricultura Orgânica</p>
<p>YEAR CERTIFICATE INTERNATIONAL MARKET</p>		
<p>CONFIRMAÇÃO DE CERTIFICAÇÃO PARA ORGÂNICO CERTIFICATION CONFIRMATION FOR ORGANIC</p>		
<p>Production certified to IBD standards in compliance with EC 2092/91 Regulation and IFOAM Standards.</p>		
<p><u>IBD standards also cover Social and Environmental Criteria such as: Child Labor, Medical Care, Personnel Development Programs and the Preservation / Recuperation of native areas.</u></p>		
CERTIFICATE NUMBER:	CA0212/05	
VALIDITY:	AUGUST 24, 2005 TO AUGUST 24, 2006.	
CERTIFIED SINCE:	JANUARY / 2000	
CESSIONÁRIO - CESSIONARY	COOPERATIVA AGRÍCOLA MISTA DO PROJETO ONÇA LTDA. TAPEROÁ / BA BRAZIL	
CÓD. PROJETO:	BA 034	
PRODUTO - PRODUCT	<p>GUARANÁ / GUARANÁ, SERINGUEIRA / RUBBER TREE, PIACAÇA / PIASABA, DENDÊ / AFRICAN PALM, URUCUM / URUCUM, CRAVO / CLOVES, PIMENTA JAMAICA / ALLSPICE PEPPER, PIMENTA REINO / BLACK PEPPER, CACAU / COCOA, CASTANHA CAJU / CASHEW NUT, COCO / COCONUT, JENIPAPO / GENIPAP.</p>	
<p>Todos os produtos são produzidos sem o uso de organismos geneticamente modificados e/ou quaisquer produtos derivados de tais organismos. O produto não é oriundo de Agricultura Biodinâmica e não pode ser comercializado como produto Biodinamico ou Demeter.</p> <p>All products are produced without the use of genetically modified organisms and / or any products derived from such organism. This product is not of Biodynamic Agriculture and may not be traded as such nor as Demeter</p>		
<p><u>Para vendas no mercado interno ou de exportação este certificado somente terá validade acompanhado do Certificado de Transação T/C.</u></p> <p><u>For sales in the national market or for export products the certificate will only be valid when the Transaction Certificate T/C is issued.</u></p>		
<p>BOTUCATU AUGUST 24, 2005</p>		
<p>MARCO ANTONIO BALBONI</p>  <p>IBD INSTITUTO BIODINÂMICO Rua Prudente de Moraes, 530 CEP 18602-060 Fone/Fax+55(0) 14 3882 5066 - Botucatu/SP ibd@ibd.com.br www.ibd.com.br</p>		<p>1/4</p>
		
		

Apêndice B. Adaptação dos parâmetros da CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) para os antibióticos testados.

Antibiótico	Código	Concentração µg/L	Zona de inibição, mm		
			R	MS	S
Ampicilina	AMP	10	≤13	14-16	≥ 17
Cefoxitina	CFO	30	≤14	15-17	≥ 18
Cloranfenicol	CLO	30	≤12	13-17	≥ 18
Eritromicina	ERI	15	≤13	14-22	≥ 23
Gentamicina	GEN	10	≤12	13-14	≥ 15
Penicilina	PEN	10	≤28	-	≥ 29
Sulfazotrim	SUT	25	≤10	11-15	≥ 16
Tetraciclina	TET	30	≤14	15-18	≥ 19
Vancomicina	VAN	30	≤9	10-11	≥ 12

S = sensível, MS = moderadamente sensível, R = resistente (CLSI, 2008b)