

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS
FOLHAS DA *Pimenta dioica* L.**

JOÃO REIS SALGADO COSTA SOBRINHO

São Luís
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS
FOLHAS DA *Pimenta dioica* L.**

JOÃO REIS SALGADO COSTA SOBRINHO

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química da UFMA como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Química (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias
Mouchrek Filho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Adenilde
Ribeiro Nascimento

São Luís
2008

Costa Sobrinho, João Reis Salgado

Estudo analítico e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* L. / João Reis Salgado Costa Sobrinho, 2008.

93 f.

Orientador: Victor Elias Mouchrek Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Química, 2008.

1. Óleo essencial vegetal – Estudo Analítico 2. Pimenta da Jamaica
3. Eugenol 4. Atividade bactericida I. Título

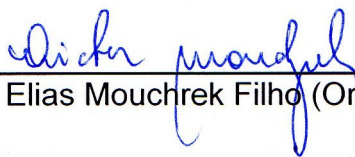
CDU 543:665.3

TÍTULO: “Estudos Analíticos e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dióica L*”

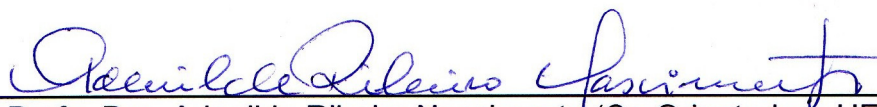
ALUNO: JOÃO REIS SALGADO COSTA SOBRINHO

Aprovado em 17 de janeiro de 2008

BANCA EXAMINADORA:



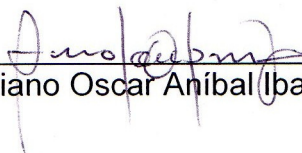
Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Orientador, DETQI-UFMA)



Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento (Co-Orientadora-UFMA)



Prof. Dr. Salvador Claro Neto (IQSC/USP/São Carlos)



Prof. Dr. Mariano Oscar Aníbal Ibañez Rojas (DETQI -MA)

Dedico este trabalho

*À minha mãe, **Maria Helena Salgado Costa**, a
mulher mais forte que já conheci, pelo amor,
carinho e dedicação imensuráveis.*

*Ao meu pai, **Antonio Alberto Alves**, pelo amor
e pelas oportunidades oferecidas.*

*Aos meus avós **Azôr Costa e Maria Eugênia
Salgado Costa**, pelo amor e carinho sempre
presentes, e pelo exemplo de vida honrada,
simples e dedicada à família.*

*À minha Avó, **Rosa Alves**, pelo amor e pelo
exemplo de vida.*

*Ao meu irmão, Marcos Aurélio Salgado Costa,
meu melhor amigo e exemplo de homem bom.*

*Aos meus sobrinhos, João Marcos, Ana
Beatriz e Ana Maria, fontes constantes de
alegrias.*

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

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

À Prof. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento, pela amizade, discussão e colaboração prestada na realização deste trabalho.

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

À Dierberger Indústria de Óleos Essenciais S.A., pelo fornecimento dos padrões utilizados neste trabalho

Ao Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) da USP-São Carlos, pela colaboração prestada nas análises químicas.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) nas pessoas do Dr. Nilson Borlina Maia e Dr. Heitor Cantarella, pela ajuda na coleta e cessão das folhas da Pimenta da Jamaica.

Ao Laboratório de Química do Mel da UEMA nas pessoas da Prof. Dra. Célia Pires e de Ana Lurdes pela ajuda na realização de algumas das análises físicas.

Às colegas da Central Analítica da UFMA, Jemmla, Vivian, Lorena e em especial a Janieyde, pela ajuda indispensável que muito auxiliou para a realização das análises químicas.

À D. Dica, auxiliar de serviços gerais do Pavilhão Tecnológico, pela colaboração prestada.

Aos amigos Antonio Araújo dos Santos e Glene, pela ajuda na forma de suporte material e humano tão gentilmente oferecidos.

*Ao meu compadre **Joelkson Diniz Ribeiro** pela providencial ajuda na realização das extrações do óleo, pelas dicas sempre pertinentes e por aquela linda criança chamada Isabelle Christinne.*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que agora, por total incompetência de minha memória, deixei de mencionar.

“O conhecimento leva à unidade, assim como a ignorância à diversidade.”

Shri Ramakrishna

“O conhecimento chega, mas a sabedoria arrasta-se.”

Alfred Tennyson

RESUMO

A *Pimenta dioica* Lindl, conhecida popularmente como pimenta da jamaica, é uma árvore de 6 a 15 m de altura, que pertence à família das Mirtaceae e tem como origem a América Central e oeste da Índia. No Brasil, a planta é encontrada em larga escala no Estado da Bahia. Seu fruto e folhas contêm um óleo essencial de grande valor econômico no mercado internacional, devido ao alto teor de eugenol (seu composto majoritário) que é largamente utilizado nas indústrias químicas e farmacêuticas. Neste trabalho, promoveu-se a extração do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl através do método de hidrodestilação, utilizando um sistema de Clevenger modificado. Algumas propriedades físicas foram avaliadas, como as constantes de densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência. Através de técnicas espectrofotométricas de UV, espectrofotométricas de IV, cromatografia gasosa e espectrometria de massas foi possível identificar o eugenol como constituinte majoritário do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl. Através do método de padrão externo usando a cromatografia gasosa foi possível quantificar o eugenol no óleo em uma concentração de 74%, concentração essa, confirmada pela técnica de espectrofotometria UV. Realizou-se também um estudo biológico através do método de Bauer-Kirby da ação do óleo essencial sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio parahaemolyticus*. Os antibióticos cefotaxima, sulfazotrim, oxacilina e vancomicina também foram testados sobre as mesmas bactérias para efeito de comparação. O óleo essencial se mostrou mais eficiente do que todos os antibióticos sobre a bactéria *V. parahaemolyticus*. Sobre a *Escherichia coli* o óleo foi menos efetivo que o sulfazotrim, mas melhor do que os outros antibióticos. Para a *Salmonella* e *Pseudomonas* sp. o óleo foi menos efetivo que o sulfazotrim e a cefotaxima, respectivamente. Na comparação com todos os outros antibióticos o óleo essencial mostrou melhores resultados. O eugenol se mostrou ser o principal responsável por esta atividade biológica sobre estes organismos.

Palavras-chave: Óleo essencial; Pimenta da jamaica; Eugenol; Atividade bactericida.

ABSTRACT

The *Pimenta dioica* Lindl, popularly known as Jamaican pepper, is a native tree from Central America and West India. The tree is a member of Mirtaceae family, can reach 6-15 meters and is found in large scale in Bahia state, northeast of Brazil. Its fruit has an essential oil with great economic value in international market, due its high eugenol level (major compound), which is largely used in chemical and pharmaceutical industries. In this work, it was extracted the essential oil from the leaves of *Pimenta dioica* Lindl by hydrodestilation process, using a Clevenger's modified system. Some physical properties were determined, like density constancy, refraction index, solubility, color and appearance. Ultra Violet Spectroscopy, FTIR and Mass Spectroscopy were used to identify the major components and these techniques confirmed the eugenol as main compound of *Pimenta dioica* Lindl. Through the method of external standard using CG, it was possible to quantify the eugenol in the oil. The concentration found was 74% and was confirmed by UV Spectroscopy with similar results. The application of the essential oil from *Pimenta dioica* Lindl and standard eugenol as bactericide agent as done by Bauer-Kirby method in *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. and *Vibrio parahaemolyticus*. The antibiotics cefotaxima, sulfazotrim, oxacilina and vancomicina were applied as comparison group. The essential oil showed more effectiveness than all antibiotics tested for the microorganism *V. parahaemolyticus*. For *Escherichia coli* the oil wasn't so effective than sulfazotrim, but better than the others. The oil was less efficient than sulfazotrin and cefotaxima for the *Salmonella* sp. and *Pseudomonas* sp. respectively. In the comparison with all others antibiotics the essential oil showed better results. The eugenol component showed to be the main responsible for the biological action against these microorganisms.

Keywords: Essential oil; Jamaican pepper; Eugenol; Bactericide activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flores e folhas da pimenta da jamaica (<i>Pimenta dioica</i> L.).....	35
Figura 2 - Frutos da pimenta da jamaica (<i>Pimenta dioica</i> L.).....	35
Figura 3 - Árvore da Pimenta da Jamaica (<i>Pimenta dioica</i> L.).....	36
Figura 4 - Fórmula estrutural do eugenol	37
Figura 5 – (A) Eugenol; (B) Metil eugenol e (C) Acetato de eugenila.	40
Figura 6 - Exsicata da <i>Pimenta dioica</i> L, depositada no Herbário da Universidade Federal de São Carlos. Fonte: Mouchrek Filho (2000).	54
Figura 7 – Sistema extrator de Clevenger.	55
Figura 8 - Curva mostrando o rendimento de extração do óleo essencial variando o tempo de extração, com massa de amostra de 30 g e temperatura de 100 °C	62
Figura 9 - Espectros de absorção no UV. A) mistura etanol/água à 60 %. B) óleo essencial (20 µL/10 mL) e C) padrão de eugenol a $2,56 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	64
Figura 10 - Espectros na região do infravermelho. A) padrão de eugenol e B) óleo essencial.	65
Figura 11 - Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas da <i>Pimenta dioica</i> . Condições fixadas: coluna HP-1 de metil silicone entre-cruzada (25 m x 0,22 mm i.d.; 0,3 µm de espessura de filme); temperatura inicial: 60 °C, final: 300 °C, tempo inicial: 2 min., final: 15 min., rampa: 2 °C min. ⁻¹ , gás de arraste: He, solvente: clorofórmio e detector seletivo de massas HP 5970 de impacto eletrônico.	67
Figura 12 - A) Espectro de massas do pico cromatográfico de eugenol do óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> . (B) Espectro de massas do padrão de eugenol.	68
Figura 13 - A) Curva analítica e B) Picos cromatográficos para as soluções contendo concentrações de padrão de eugenol de (1) $0,6 \times 10^{-2}$; (2) $1,2 \times 10^{-2}$; (3) $1,8 \times 10^{-2}$ e (4) $2,4 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹	69
Figura 14 - (A) Curva de adição padrão de solução contendo 20 µL de solução estoque preparada com 100 µL de amostra de óleo essencial, em 10 mL de mistura etanol/água a 60 %. (B) Espectros de absorção da amostra e das concentrações de padrão de eugenol: (1) solução etanol/água 60%; (2) amostra; (3) $1,28 \times 10^{-4}$; (4) $2,56 \times 10^{-4}$; (5) $3,85 \times 10^{-4}$ e (6) $5,12 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	71
Figura 15 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal <i>Pimenta dioica</i> L. e pelo padrão de eugenol (C).....	74
Figura 16 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>Pseudomonas sp.</i> causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal <i>Pimenta dioica</i> L. e pelo padrão de eugenol (C).....	75
Figura 17 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>Salmonella sp.</i> causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal <i>Pimenta dioica</i> L. e pelo padrão de eugenol (C).....	76
Figura 18 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>V. parahaemolyticus</i> . causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal <i>Pimenta dioica</i> L. e pelo padrão de eugenol (C).....	77
Figura 19 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).....	80

Figura 20 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).....	81
Figura 21 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>Salmonella</i> sp. causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).....	82
Figura 22 - Halos de inibição de crescimento da bactéria <i>V. parahaemolyticus</i> causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).....	83
Figura 23 – Comparação dos halos de inibição dos antibióticos testados (Cefotaxima, Sulfazotrim, Oxacilina e Vancomicina), dos óleos da <i>Pimenta dioica</i> e do eugenol para as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Salmonella</i> sp.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físicos dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie <i>Pimenta dioica</i> L. em relação aos encontrados na literatura.	63
Tabela 2 - Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do infravermelho.	66
Tabela 3 - Valores da percentagem de eugenol na composição do óleo essencial extraídos de folhas da <i>Pimenta dioica</i> L.	70
Tabela 4 - Comparação entre os valores de eugenol nos óleos essenciais obtidos de massas constantes de folhas e frutos analisados por cromatografia gasosa.	70
Tabela 5 - Comparação entre as técnicas analíticas de cromatografia e de espectrofotometria para determinação quantitativa do eugenol no óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i>	72
Tabela 6 - Atividade bactericida dos óleos essenciais, do padrão de eugenol e dos antibióticos testados.	73
Tabela 7 - Parâmetros de referência para os antibióticos testados.	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATP	Adenosine Triphosphate
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Hidroxitolueno butilado
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CTX	Cefotaxima
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EM	Espectrometria de Massas
FTIR	Fourier Transform InfraRed
HP	Hewlett-Packard
HUFSCar	Herbário da Universidade Federal de São Carlos
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
ISO	International Standart Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
LPQA	Laboratório de Pesquisa em Química Analítica
MS	Moderadamente Sensível
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
OXA	Oxacilina
PABA	para-aminobenzoic acid

R	Resistente
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Sensível
SNC	Sistema Nervoso Central
SUH	Síndrome Urêmica Hemolítica
SUT	Sulfazotrim
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UV	Ultravioleta
VAN	Vancomicina
ZIC	Zona de Inibição de Crescimento

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	15
Capítulo 1	17
INTRODUÇÃO.....	17
Capítulo 2	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Plantas Medicinais.....	19
2.2. Óleos Essenciais	22
2.2.1. Processos de extração	31
2.2.2. Aplicações dos Óleos Essenciais	33
2.2.3. Avaliação da Qualidade dos Óleos Essenciais	33
2.2.4. Análise dos Componentes dos Óleos Essenciais.....	34
2.3. A Pimenta da jamaica (<i>Pimenta dioica</i> Lindl)	34
2.4. O Eugenol	40
2.5. Técnicas Analíticas	41
2.5.1. Cromatografia Gasosa (CG)	41
2.5.2. Espectrometria na Região do Ultravioleta (UV)	42
2.5.3. Espectrometria Vibracional na Região do Infravermelho (IV)	42
2.5.4. Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM).....	43
2.6. Métodos de quantificação	44
2.7. Teste de suscetibilidade antimicrobiana pelo Método de Bauer-Kirby.....	45
2.8. Antibióticos	46
2.8.1. Cefotaxima	47
2.8.2. Oxacilina.....	47
2.8.3. Vancomicina.....	48
2.8.4. Sulfazotrim	48
2.9. Microrganismos	49
2.9.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	49
2.9.2. <i>Salmonella</i> sp.....	50
2.9.3. <i>Escherichia coli</i>	51
2.9.4. <i>Pseudomonas</i> sp.	51
Capítulo 3	53
MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. Obtenção do óleo essencial das folhas da <i>Pimenta dioica</i> L.	53
3.1.1 Origem, Coleta e Preparo da Amostra Vegetal	53
3.1.1. Moagem do material vegetal	54
3.1.2. Extração do óleo essencial.....	54
3.1.3. Avaliação da Cinética de Extração do Óleo Essencial.....	55
3.2. Características físicas do óleo essencial.....	56
3.2.1. Densidade	56
3.2.2. Solubilidade em etanol (70%)	56
3.2.3. Índice de refração	56
3.2.4. Cor	56
3.2.5. Aparência.....	56

3.3. Análises Químicas do Óleo Essencial.....	57
3.3.1. Análise e Quantificação por Espectrofotometria no UV-VIS	57
3.3.2. Determinações Cromatográficas.....	57
3.3.2.1. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	57
3.3.2.2. Quantificação por Cromatografia Gasosa.....	58
3.3.3. Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho (IV)	58
3.3.4. Padrão	58
3.4. Testes biológicos usando o óleo essencial.....	58
3.4.1. Microrganismos testados	58
3.4.2. Antibiógrama	59
3.4.2.1. Preparo do Inóculo	59
3.4.2.2. Inoculação das Placas	59
3.4.2.3. Antibióticos Testados	59
3.4.2.4. Leitura dos Resultados	60
Capítulo 4	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Extração do óleo essencial da <i>Pimenta dióica</i> L.....	61
4.1.1. Cinética.....	61
4.1.2. Rendimento.....	62
4.2. Características Físicas do Óleo Essencial.....	62
4.3. Análises Espectrométricas do Óleo Essencial	63
4.3.1. Análise Espectrométrica na Região do Ultravioleta.....	64
4.3.2. Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho	65
4.4. Análises por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas	66
4.5. Quantificação por Cromatografia Gasosa	69
4.6. Quantificação por Espectrometria de Ultravioleta	71
4.7. Comparação entre os Métodos e Técnicas Utilizados para a Quantificação do Eugenol.....	72
4.8. Análise da atividade bactericida do óleo essencial das folhas da espécie <i>Pimenta dioica</i> Lindl e do padrão de eugenol	73
4.9. Antibiógramas.....	79
4.9.1. Antibiógrama para o <i>Escherichia coli</i>	80
4.9.2. Antibiógrama para <i>Pseudomonas sp.</i>	81
4.9.3. Antibiógrama para <i>Salmonella sp.</i>	82
4.9.4. Antibiógrama para <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	82
4.10. Comparação entre a atividade antimicrobiana dos óleos, do eugenol e dos antibióticos testados.....	83
Capítulo 5	85
CONCLUSÃO	85
Capítulo 6	86
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	86
Capítulo 7	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O uso de técnicas analíticas e microbiológicas na pesquisa de óleos essenciais de espécies vegetais, tem sido de grande valia na identificação e quantificação dos diversos constituintes químicos e na aplicação como agente bactericida.

O termo óleo essencial está relacionado a misturas de substâncias orgânicas de baixa massa molecular, odor forte e característico de origem vegetal. Na planta essa mistura de substâncias tem funções de proteção contra insetos, fungos e participam em funções secundárias no metabolismo da planta. São estas substâncias que em graus variados, dependendo da planta em questão, do local e da época onde são obtidas, apresentam funções medicinais de grande interesse.

A utilização de plantas com fins medicinais vem desde épocas remotas, existindo evidências de seu uso desde a pré-história. Inicialmente empiricamente, observando a relação dos outros animais com as mesmas, os seres humanos foram experimentando e comprovando a importância destas verdadeiras usinas de fármacos naturais para a sua saúde.

Modernamente o homem vem aproveitando o conhecimento de culturas mais primitivas, como a dos índios, com o fim de utilizar as plantas na luta contra males graves como o câncer e outros. Por isso a importância da manutenção de nossas florestas intactas, já que são depositárias inequívocas de substâncias que serão futuramente, com o avanço da pesquisa, a resposta para muitos desses males.

É de suma importância a pesquisa analítica nesta área, uma vez que, como já foi dito, a concentração das substâncias de interesse pode variar muito de lugar para lugar, de época para época, mesmo tratando-se de plantas de mesma espécie. Quantificar, identificar e muitas vezes isolar uma determinada substância numa planta, auxilia em muito no uso desta para um determinado fim, seja medicinal ou outro qualquer.

Com o objetivo de identificar e quantificar substâncias de interesse no óleo essencial das folhas da “Pimenta da Jamaica” (*Pimenta dioica* L.) e sua ação antibiótica sobre determinadas bactérias, realizou-se este trabalho de mestrado em Química Analítica da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conhecimento acumulado de geração para geração, repassado por nossos avós do uso de plantas como remédios na forma de infusões, chás, ou em sua forma natural, tem origem muito, muito,... remota. O homem passou da observação pura e simples do comportamento dos outros animais em relação às plantas, em que descobria quais podiam ser ingeridas e quais efeitos mais evidentes elas provocavam, até à pesquisa mais acurada nos nossos dias de princípios ativos de interesse em diversas áreas. A arte dos benzedores, curandeiros e xamãs, herdada dos magos e feiticeiros de outrora, pode ser vista hoje, nos trabalhos de pesquisa em diversos laboratórios científicos espalhados pelo mundo. Essas pesquisas avaliam experimentalmente a correção deste conhecimento, objetivando, como finalidade mais nobre, a descoberta de novos medicamentos para melhoria da qualidade de vida da população em geral. (DISTASI, 1996).

Um dos assuntos mais fascinantes na pesquisa com plantas medicinais é a origem desse conhecimento, as formas, os procedimentos que foram utilizados para descobrir as virtudes terapêuticas de várias espécies vegetais. Seguramente, o método mais utilizado foi de tentativa e erro, ainda muito comum e útil em diversas áreas do conhecimento científico, o que revela a íntima ligação entre o conhecimento popular e o científico. Desse modo, percebe-se que um dos principais procedimentos utilizados para essas descobertas pode ter sido a observação de animais, domesticados ou não. É notório, por exemplo, que animais como o cão e o gato conseguem esvaziar seus estômagos consumindo ervas vomitativas. Também, é sabido que os efeitos excitantes da espécie *Coffea arabica* (café) e a posterior identificação dos compostos responsáveis por esse efeito devem-se à famosa fábula do Mulah Schadelich, pastor de cabras, que verificou a excitação de suas cabras após ter consumido dos frutos dessa espécie, preparando uma bebida desses frutos para manter-se acordado e conseguir fazer suas orações e a leitura do Alcorão. (DISTASI, 1996).

Estes exemplos demonstram a importância, não apenas dos magos, bruxos, feiticeiros e alquimistas, mais também do conhecimento disseminado por toda a população, que contribui para a compreensão da natureza e serve como subsídio na seleção de plantas para estudos detalhados ensejando a descoberta de novos medicamentos. Nesse contexto, não

se pode deixar de ressaltar o valioso conhecimento acumulado por nossos índios das excelências da nossa riquíssima flora, conhecimento que de tão valioso, desperta o interesse das multinacionais farmacêuticas, que não têm o mínimo pudor de apropriar-se deste conhecimento sem a devida paga a quem de fato o originou.

A distância entre o conhecimento popular e o conhecimento científico deve, por essas razões, ser estreitada, pois a ciência nada mais é que o censo comum refinado e disciplinado, assim sendo, os pesquisadores devem respeitar e atribuir o devido valor a este conhecimento empírico, pois dele fazem uso para a execução de suas pesquisas. (DISTASI, 1996; ALVES, 1988).

Entre os produtos obtidos de vegetais, encontram-se os óleos essenciais de algumas espécies de plantas aromáticas, os quais já são largamente utilizados na indústria para a produção de sabonetes, perfumes e outros produtos de higiene pessoal. Estudos sobre a avaliação das atividades inseticida, bactericida e fungicida dos óleos essenciais de algumas espécies de plantas têm mostrado resultados interessantes, em várias pesquisas pelo mundo todo, e em especial em alguns grupos de pesquisa aqui no Brasil. (LEMOS, 1990).

2.1. Plantas Medicinais

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestações artísticas, culturais e religiosas e como meio restaurador da saúde. [...] Nos dias de hoje representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de serem uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo gênio humano. (SCHENKEL, GOSMAN e PETROVICK, 1999).

A humanidade desde tempos longínquos utiliza abundantemente as plantas com fins medicinais. O homem antigo era praticante do curandeirismo, e como tal relacionava as plantas à cura de diversas enfermidades, tais como disenterias, enterites, infecções cutâneas e dores musculares. Comenta-se que quando o primeiro humano surgiu no planeta as plantas já existiam há mais de 400 milhões de anos. A utilização delas como medicamento, provavelmente é tão antiga quanto o aparecimento do próprio homem (o que só ocorreu cerca de 50 mil anos atrás). Há registros remotos, como desenhos em cavernas, escritos e símbolos, que revelam uma ligação muito íntima do homem com a natureza, principalmente com as plantas. (SOARES, 2007).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joachin. Foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Nele é enumerado mais ou menos 100 doenças e descrito um grande número de drogas de natureza animal e vegetal.

Até o século XVIII os recursos terapêuticos eram predominantemente constituídos por plantas e extratos vegetais, ou seja, os medicamentos pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular. Sabe-se que eles constituíam a parte qualitativamente mais importante dos recursos terapêuticos da época, já que muitas das espécies da época ainda figuram em farmacopéias mais recentes.

No Brasil o uso das plantas tem origem na cultura indígena: guaraná e jaborandi; dos africanos: erva-de-São-Caetano e o boldo; e dos europeus: camomila e a malva. Hoje o uso desses vegetais não se restringe apenas às zonas rurais ou regiões desprovidas de assistências médicas e farmacêuticas, são amplamente usados também em centros urbanos como forma alternativa e/ou complementar da medicina oficial. (MOUCHREK FILHO, 2000).

Define-se planta medicinal como sendo qualquer planta que contendo substâncias biologicamente ativas, possa ser usada com fins terapêuticos ou que possa fornecer precursores para a síntese química farmacêutica. Ao passo que droga vegetal é a parte da planta medicinal que é usada para fins terapêuticos. (World Health Organization, 2007).

A diversidade da nossa flora, por ser tão vasta, nos defronta com a situação de várias espécies, de possível interesse, que não foram sequer catalogadas. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. (DIAS, 1999).

Segundo Wall e Wani (1999) as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Soejarto (1999) comenta que apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.

Segundo Demo et al. (2001) há um crescimento do uso de compostos antimicrobianos naturais com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos e para o controle de moléstias de procedência microbiana em humanos, animais e vegetais. As plantas têm se destacado e vêm tornando-se cada vez mais importantes quando relacionadas, principalmente, à cura de diversas doenças de origem bacteriana.

O aumento da resistência de muitos microrganismos é um fator importante no crescimento do interesse no uso das plantas. Duffy et al. (1999) mencionam que a aplicação desordenada de antibióticos na medicina veterinária e humana é largamente responsável pela ocorrência de bactérias resistentes. Assim, várias cepas de bactérias patogênicas estão associadas às infecções emergentes e reemergentes.

Para Nisbet e Moore citados por Nodari e Guerra (1999), ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Além disso, como produtos de organismos que possuem muitas similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais às antimicrobianas a eles associadas.

Díaz e Jorge (2001) destacam as numerosas investigações que têm sido realizadas em busca de novos compostos com atividades biológicas a partir de fontes naturais, destacando-se os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas. Ahmad e Beg (2001) destacam que os agentes antimicrobianos oriundos de plantas são abundantes e a investigação de novas metodologias enfatizam o poder de algumas preparações com esses vegetais no tratamento e na cura de infecções, corroborando assim o conhecimento popular.

Schenkel, Gosman e Petrovick (1999) comentam em seu trabalho da complexidade da tarefa de desenvolver, a partir de plantas medicinais, produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis, como se exige dos demais medicamentos. Os exemplos utilizados ilustram ainda que muito frequentemente a atividade de extrativos vegetais não é reproduzida pelas substâncias ativas isoladas, sendo a sua ação determinada por mais de um componente do extrato, que pode eventualmente atuar sobre os mesmos processos bioquímicos, mas pode também contribuir de outras maneiras, modificando a solubilidade, alterando fenômenos de absorção ou influenciando sobre a estabilidade. Muitos outros exemplos de complexidade semelhante podem ser citados, como os casos das drogas ginseng, valeriana, alho e maracujá. Deve-se salientar ainda a situação

paradoxal das plantas medicinais brasileiras, consideradas como altamente promissoras, mas das quais tão pouco se conhece.

Nos últimos 30 anos, os estudos com extratos de plantas consideradas medicinais (pelo conhecimento popular), têm sido aconselhados pela Organização Mundial de Saúde. (World Health Organization, 2007). Segundo Srinivasan et al. (2001), isso levou a organização a compilar um inventário com mais de 20.000 espécies de plantas medicinais.

É amplo o universo de disciplinas envolvidas na pesquisa de produtos naturais, extremamente complexo e intrincado, seja quando se buscam novos compostos quimicamente definidos, seja na padronização de preparados tradicionais, fitoterápicos ou fitofármacos. Desde a identificação de uma planta utilizada há muito tempo por uma comunidade isolada, até a sua total caracterização e isolamento de compostos de interesse em laboratório, essa pesquisa envolve várias fases inter-relacionadas e seqüenciadas, que como objetivo final e nobre, visa a melhoria das condições de vida dos seres humanos. (ALVES, 1988).

2.2. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são substâncias voláteis extraídas de plantas aromáticas, constituindo matérias-primas de grande importância para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia. Essas substâncias orgânicas, puras e extremamente potentes são considerados a alma da planta e são os principais componentes bioquímicos de ação terapêutica das plantas medicinais e aromáticas.

De acordo com a International Standard Organization (ISO) óleos essenciais definem-se como (SIMÕES e SPTZER, 1999):

[...] os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Eles são assim chamados por serem: geralmente de aparência oleosa e líquidos, voláteis; geralmente possuem aroma agradável; solúveis em solventes apolares, como o éter. Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que nesse caso são denominadas hidrolatos.

As substâncias odoríferas em plantas foram consideradas por muito tempo como “desperdício fisiológico”, ou mesmo produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário. Atualmente, considera-se a existência de funções

ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, no combate a predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento de temperatura, entre outras. Da mesma forma, efeitos alelopáticos têm sido registrados para terpenos voláteis de *Eucalyptus globulus* Labill, *E. camaldulensis* Dehnh (Myrtaceae), *Artemisia californica* Less. (Asteraceae) e *Salvia leucophylla* Green (Lamiaceae), presentes no chaparral californiano, que causam um efeito inibitório tão grande através de seus óleos voláteis, que outras plantas são inibidas em um raio de um a dois metros, gerando zonas de solo nu em torno dos arbustos (ou grupos de arbustos) dessas espécies. Existem trabalhos demonstrando que a toxicidade de alguns componentes dos óleos essenciais constitui uma proteção contra predadores e infestantes. Kesley et al. citados por Simões e Spitzer (1999) mostraram que o mentol e a mentona, por exemplo, são inibidores do crescimento de vários tipos de larvas. Harbone citado pelos mesmos autores encontrou evidências de que alguns insetos utilizam óleos voláteis seqüestradores de plantas para defenderem-se de seus predadores. Assim, os vapores de certas substâncias como citronelal (utilizado por formigas) e α -pineno (utilizado por cupins) podem causar irritação suficiente em um predador para fazê-lo desistir de um ataque. Certos himenópteros, por exemplo, seqüestram (sem alteração química) α e β -pineno, entre outros componentes, de *Pinus sylvestris* L. (uma conífera européia). Dessa forma, as larvas desses insetos se defendem de predadores como as formigas.

Presentes em várias partes das plantas (folhas, flores, madeiras, ramos, galhos, frutos, rizomas), são compostos formados por várias substâncias químicas, que variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre, havendo sempre a prevalência de uma ou duas delas, que assim irão caracterizar os aromas. São obtidos pelos processos de destilação a vapor, extração por solvente ou por pressão. Nem todos os óleos essenciais possuem aroma agradável ao olfato, apesar das suas propriedades terapêuticas. Quase sempre são dotados de atividade óptica, com índices de refração elevados. (WILLIANS, 1996).

Além dos óleos essenciais obtidos de plantas (fitogênicos), produtos sintéticos são encontrados no mercado. Esses óleos sintéticos podem ser imitações dos naturais ou composições de fantasia. Para uso farmacêutico, somente os naturais são permitidos pelas farmacopéias. Exceções são aqueles óleos que contém somente uma substância, como o óleo essencial de baunilha (que contém vanilina). Nesses casos, algumas farmacopéias permitem também os equivalentes sintéticos. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

É interessante notar que os óleos essenciais (óleos vegetais voláteis) diferem-se quimicamente dos óleos vegetais fixos e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Já os óleos vegetais fixos são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Enquanto que os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado.

Em geral, as espécies de onde se extraem os óleos essenciais apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípio ativo no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano. Martins et al. citados por Reis e Mariot (1999) mencionam que, de acordo com a substância ativa da planta, existem horários em que a concentração desses princípios é maior. No período da manhã é recomendada a colheita de plantas com óleos essenciais e alcalóides, e no período da tarde plantas com glicosídeos. Este critério é importante no que diz respeito à qualidade química do produto, pois uma baixa concentração da substância ativa no material pode levar a uma desconfiança na pureza do produto. O conhecimento do momento correto de coleta do material desejado leva à obtenção de produtos de melhor qualidade. Geralmente, essa variação ocorre em função do estágio em que se encontra a planta, como na plena floração ou no período que antecede a floração. Sem o conhecimento de como realizar a colheita e de como proceder após a mesma pode-se perder todo o trabalho anteriormente despendido.

A pesquisa com plantas aromáticas já é bastante disseminada no mundo todo e tem sido utilizada com os mais variados fins pelo homem. Na literatura se encontram trabalhos relacionando seus constituintes majoritários e minoritários, com efeitos combinados ou não, e sua ação sobre os mais variados patógenos.

Há uma diferença clara entre as atividades farmacológicas de uma droga vegetal rica em óleos essenciais com as atividades farmacológicas do óleo isolado da mesma. Também se deve levar em consideração que, se é possível estabelecer a atividade farmacológica de uma substância isolada, o mesmo não é tão fácil para um óleo volátil que, além de ser uma mistura complexa, pode ter sua composição química alterada por vários fatores, tais como: temperatura, umidade relativa, exposição ao sol, ventos, estocagem etc. Entretanto, algumas propriedades farmacológicas estão relativamente bem estabelecidas, por exemplo: ação carminativa; ação antiespasmódica; ação estimulante; ação cardiovascular; ação sobre o SNC; ação anestésica tópica; ação antiinflamatória; além da ação anti-séptica, uma vez que alguns óleos voláteis inibem o crescimento de vários tipos de bactérias, fungos e insetos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e álcoois. Os compostos: citral,

geraniol, linalol, cineol, terpineol têm alto poder anti-séptico, superior ao do próprio formol. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

Charles, Simon e Wood (1990) trabalhando com *Ocimum micranthum* Willd., uma erva aromática anual usada como bebida local e planta medicinal, nativa de terras baixas das Américas Central e Sul e do oeste da Índia, encontraram no seu óleo essencial 20 compostos, onde foram identificados o 1,8-cineol, o eugenol, o β -cariofileno, o β -selineno e elementos isômeros como componentes majoritários. O total de sesquiterpenos encontrados foram de 48,4, 85,8 e 78,5% nos óleos das folhas, flores e caule, respectivamente. Isso demonstra a diversidade na concentração e composição de um óleo essencial, que pode ocorrer numa mesma planta, na medida em que trabalhamos com suas folhas, seus frutos ou seu caule.

Marotti, Piccaglia e Giovanelli (2005) estudaram a composição do óleo essencial de cultivares italianas do manjerição (*Ocimum basilicum* L.) relacionadas às suas características morfológicas. Os parâmetros morfológicos de dez cultivares de manjerição foram registrados no início da floração e os óleos essenciais, obtidos por hidrodestilação foram analisados por CG e CG-EM. A composição dos óleos essenciais, todos caracterizados por elevadas quantidades de linalol, incluíram três quimiotipos: “linalol”, “linalol e metil-chavicol” e “linalol e eugenol”. Dois quimiotipos cada tiveram o próprio conjunto de caracteres morfológicos, considerando que dois grupos de cultivares com parâmetros morfológicos diferentes pertenceram ao mesmo quimiotipo. Numa mesma espécie, portanto, infere-se que podem haver diferenças tão marcantes que quase pode-se classificá-las em espécies diferentes. Essa variação vem de solos com composição química diferentes, climas e várias condições que acabam criando esses quimiotipos, aos quais poderíamos, numa aproximação grosseira, chamar de quimioespécies, já que se diferenciam apenas em sua composição.

A ação anti-séptica de um óleo aromático sobre um determinado microrganismo pode se dar devido a um constituinte ou a ação conjunta de dois ou mais constituintes. Em um trabalho de Oxenham, Svoboda e Walters (2005) foi pesquisada a ação antifúngica e fungicida dos óleos de dois quimiotipos de manjerição (*Ocimum basilicum*) e de seus constituintes majoritários em experiências *in vitro* e *in vivo*. O crescimento micelial do fungo *Botrytis fabae* (patógeno vegetal) foi reduzido significativamente pelo óleo dos dois quimiotipos – metil chavicol e linalol – como também por seus componentes majoritários individualmente, sendo que destes o metil chavicol, linalol, eugenol e eucaliptol reduziram o crescimento fúngico significativamente. Combinando os componentes puros nas mesmas proporções encontradas nos óleos obtiveram-se reduções similares do crescimento fúngico,

indicando que os efeitos antifúngicos dos óleos foram devidos principalmente aos seus componentes majoritários.

Dadalioglu e Evrendilek (2004) determinaram a composição química e os efeitos bactericidas dos óleos essenciais do orégano turco (*Origanum minutiflorum*), louro (*Laurus nobilis*), alfazema espanhola (*Lavandula stoechas* L.) e funcho (*Foeniculum vulgare*) em patógenos comuns de alimentos. Doses crescentes dos óleos essenciais (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 80 µL/ml) foram testados sobre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados revelaram que os óleos essenciais exibiram uma forte atividade antibacteriana sobre as bactérias testadas. A análise por CG-EM revelou o carvacrol (68,23%), 1,8-cineol (60,72%), fencon (55,79%) e trans-anetol (85,63%) como constituintes majoritários dos óleos essenciais do orégano turco, louro, alfazema espanhola e funcho, respectivamente.

Também nessa linha de pesquisa Facey et al. (2005) determinaram a composição química e a atividade biológica do óleo essencial obtido por hidrodestilação da *Hyptis verticillata* Jacq., para isso utilizaram análises em CG e CG-EM combinados. O óleo apresentou altas concentração de sesquiterpenoides. O óleo exibiu atividade quimioesterilizante sobre o carrapato do gado (*Boophilus microplus* Canest.) e ação tóxica sobre a *Cylas formicarius elegantulus* Summer adulto, a mais destrutiva praga da batata doce (*Ipomoea species*).

Iacobellis et al. (2005) trabalhando com os óleos essenciais extraídos dos frutos do cominho (*Cuminum cyminum* L.) e alcarávia (*Carum carvi* L.), analisaram-nos em CG e CG-EM e determinaram sua atividade anti-bacteriana. Encontraram como componentes majoritários do óleo de *C. cyminum*: o p-menta-1,4-dien-7-al, cumin aldeído, γ-terpineno, e β-pineno; enquanto aqueles do *C. carvi* foram: carvona, limoneno, germacreno D e trans-dihidrocarvona. A atividade anti-bacteriana foi determinada com o método de agar difusão sobre espécies de bactérias gram positivas e negativas, sendo particularmente alta sobre os gêneros *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* e *Agrobacterium*, que são responsáveis por várias doenças de plantas ou cogumelos de largo espectro mundial. Em geral foi observada baixa atividade sobre bactérias do gênero *Pseudomonas*. Os autores relatam que esses resultados sugerem o potencial uso destes óleos no controle de doenças provocadas por bactérias.

Pesquisando a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de 17 plantas sobre *Escherichia coli* e *Salmonella entérica* em sucos de maçã, Friedman et al. (2005) avaliaram essas atividades e de seus componentes sobre estas bactérias. Concluíram que sobre a *E. coli*

os compostos mais efetivos foram: carvacrol, óleo de orégano, geraniol, eugenol, óleo de folha de canela, citral, óleo do broto do cravo-da-índia, capim-limão, óleo de canela e de óleo de limão. Para a *S. Entérica* foram óleo de melissa, carvacrol, óleo de orégano, terpineol, geraniol, óleo de limão, citral, óleo de capim limão, óleo das folhas de canela e linalol. Os agentes bacterianos foram então classificados em de rápida ação e de ação lenta. Análises em HPLC mostraram que os resultados da atividade bactericida estão relacionados com a composição dos óleos. Para os autores os resultados permitem encontrar novos caminhos para conservação do suco de maçã e de outros alimentos.

Kim, Marshal e Wei (2005) analisaram a ação antibacteriana de alguns óleos essenciais sobre 5 (cinco) agentes patógenos de origem alimentar. As bactérias testadas foram *Escherichia coli*, *E. coli* 0157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Vibrio vulnificus* em discos de papel. Oito constituintes foram então testados em meio líquido para determinar a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida (CMI e CMB). *V. vulnificus* foi o mais suscetível usando os ensaios em disco. Carvacrol mostrou a atividade bactericida mais forte sobre todos as espécies, enquanto limoneno, nerolidol e p-ioneno foram os mais inativos. Carvacrol foi o mais efetivo bactericida sobre *S. Typhimurium* e *V. vulnificus* em meio líquido. Citral e perilaldeido apresentaram atividade sobre *V. vulnificus*. Terpineol e linalol foram menos potentes sobre os espécimes testados. Citral, geraniol e perilaldeido eliminaram completamente *E. coli*, *E. coli* 0157:H7 e *S. Typhimurium*, enquanto citronelal matou *V. vulnificus*. Estes compostos podem servir como potenciais agentes antibacterianos para inibir o crescimento de patógenos em alimentos.

Analisando a composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Sideritis* da Grécia, Aliogiannis et al. (2005) utilizaram várias técnicas de CG-EM. Um total de 99 diferentes compostos foram identificados e significantes diferenças (qualitativas e quantitativas) foram observadas entre as amostras. As atividades antimicrobianas *in vitro* dos óleos essenciais sobre seis tipos de bactérias e três de fungo foram avaliadas. Os resultados sugeriram que a atividade antimicrobiana dos óleos podem ser atribuídos, em considerável grau, a existência de α -pineno e principalmente ao carvacrol, que pareceu possuir a mais forte atividade sobre todos os microrganismos testados.

Valero e Giner (2006) pesquisaram os efeitos antimicrobianos de componentes de óleos essenciais no crescimento do *Bacillus cereus* INRA L2104 e na qualidade sensorial do caldo de cenoura. Para isso eles inocularam esporos ativados de *B. cereus* em caldo de cenoura tyndalizado. O efeito de várias concentrações de borneol, carvacrol, cinnamaldeído, eugenol, mentol, timol e vanilin foram determinados. Concentrações específicas de

cinnamaldeído, carvacrol e timol inoculados no caldo inibiram completamente o crescimento bacteriano por mais de 60 dias a 16°C. Baixas concentrações dos três antimicrobianos prolongaram a fase “lag”, reduziram a taxa de crescimento exponencial e a densidade da população final das culturas. O estudo das características sensoriais dos suplementos dos caldos sugeriram que baixas concentrações de cinnamaldeído aumentaram o gosto do caldo de cenoura e que não houve nenhum efeito adverso no sabor e cheiro do caldo de cenoura em baixas concentrações.

A ação antifúngica do hissopo (*Hyssopus officinalis*) também foi estudada por Letessier, Svoboda e Walters (2001) em experimentos *in vitro* e *in vivo*. O crescimento micelial dos fungos *Pyrenophora avenae* e *Pyricularia oryzae* (patógenos de plantas) foi completamente inibido por 0,4% do óleo de hissopo. Como na pesquisa do parágrafo anterior, os componentes individuais do óleo de hissopo (L-bornil, acetato, isopinocanfeol e pinocanfona), também reduziram o crescimento do *P. avenae* e, algumas misturas contendo isopinocanfeol inibiram completamente o crescimento fúngico. Já o crescimento do *P. oryzae* foi menos afetado pelos componentes individuais do óleo.

Kordali et al. (2005) determinaram a composição química e ação antioxidante do óleo essencial da *Artemisia dracunculus*, também avaliaram os efeitos antifúngicos e antibacterianos dos óleos de *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum* e *Artemisia spicigera*. O óleo da *A. dracunculus* obtido por hidrodestilação foi analisado por CG-EM, encontrando-se trinta compostos representando 99,5% do total do óleo. Os componentes predominantes foram (Z)-anetole (81,0%), (Z)- β -ocimeno (6,5%), (E)- β -ocimeno (3,1%), limoneno (3,1%), e metil-eugenol (1,8%). As atividades antibacterianas e antifúngicas dos óleos essenciais de *A. Dracunculus*, *A. absinthium*, *A. santonicum* e *A. spicigera* também foram avaliadas. Em geral os óleos exibiram potente atividade antifúngica em um largo espectro de fungos patógenos agrícolas. Quanto à atividade antibacteriana os óleos de *A. santonicum* e *A. spicigera* mostraram atividade antibacteriana sobre um largo espectro de bactérias.

A atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial isolado da *Thymbra capitata* L. e do *Origanum vulgare* L. foram testados por Faleiro et al. (2005) sobre 41 variedades de *Listeria monocytogenes*. O componente majoritário do óleo de *T. capitata* foi o carvacrol (79%) enquanto que no de *O. vulgare* três componentes representaram 70% do óleo, foram eles: timol (33%), γ -terpineno (26%), e p-cimeno (11%). O óleo da *T. capitata* apresentou uma ação anti-listeriose significativamente mais forte que o do *O. vulgare* e que o do cloranfenicol. A atividade anti-oxidante também foi testada e mais uma vez o óleo da *T.*

capitata apresentou resultados significativamente melhores que o da *O. vulgare*. Os autores concluíram que o uso combinado dos óleos da *T. capitata* e do *O. vulgare* podem constituir um poderosa ferramenta no controle de *L. monocytogenes* em alimentos e em outras indústrias.

Pesquisando a atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de vários extratos obtidos de partes aéreas de *Thymus eigii*, Tepe et al. (2005) concluíram que o óleo desta planta possui forte ação antimicrobiana, embora outros extratos não-polares e subfrações terem mostrado moderada atividade e os extratos polares permanecido quase inativos. As análises em CG-EM do óleo identificaram 39 compostos, representando 93,7% do óleo; timol (30,6%), carvacrol (26,1%), e p-cimeno (13,0%) foram os componentes majoritários. Nos ensaios de atividade antioxidante a subfração polar do extrato metanólico mostrou atividade superior a todos os extratos testados, apenas 16,8 µg/ml dele proveu 50% de inibição no ensaio usando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e, enquanto que todos os extratos, principalmente os polares, pareceram inibir a oxidação do ácido linoleico. Estes dados são referendados pela análise de fenólicos totais, que indicam que o potencial antioxidante dos extratos foi bastante relacionada com seus constituintes fenólicos.

Kordali (2005) pesquisou a composição química e as atividades antifúngicas e antioxidantes dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação, de três espécies de artemísia turcas. Os óleos de *Artemisia absinthium*, *Artemisia santonicum* e *Artemisia spicigera* foram analisados por CG-EM, e um total de 204 componentes foram identificados. Os componentes majoritários desses óleos foram: canfor (34,9-1,4%), 1,8-cineole (9,5-1,5%), camazuleno (17,8-nd%), nuciferol propionato (5,1-nd%), nuciferol butanoato (8,2-nd%), cariofileno oxido (4,3-1,7%), borneol (5,1-0,6%), r-terpineol (4,1-1,6%), espatulenol (3,7-1,3%), cubenol (4,2-0,1%), β-eudesmol (7,2-0,6%), e terpinen-4-ol (3,5-1,2%). A atividade antifúngica foi testada sobre 11 fungos de planta e comparada com um reagente antifúngico comercial, o benomil. Os resultados mostraram que todos os óleos tiveram potentes efeitos inibitórios sobre todos os fungos testados. O canfor puro e o 1,8-cineole, que são os componentes majoritários dos óleos, foram também testados como agentes antifúngicos sobre as mesmas espécies. Ao contrário dos óleos essenciais, esses componentes puros se mostraram aptos a apresentar atividade antifúngica apenas sobre algumas espécies. Além disso, a atividade antioxidante dos óleos essenciais, do canfor e do 1,8-cineole, foram determinados *in vitro*. Todos os óleos essenciais estudados mostraram atividade antioxidante, contudo seus componentes majoritários, o canfor e o 1,8-cineole não.

Formas diferentes de extração também são reportadas, como no trabalho de Tuberoso et al. (2005) que investigaram a ação antioxidante, antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial das flores da *Achillea ligustica* All. obtido por hidrodestilação e por um sistema de extração por destilação simultânea. Foi feita a análise por CG-EM, onde foram detectados 96 componentes. Uma forte variabilidade química dependendo da origem das amostras foi observada, sendo os componentes majoritários a santonila álcool (6,7-21,8%), borneol (3,4-20,8%), sabinol (2,1-15,5%), trans-sabinil acetato (0,9-17,6%), α -tujona (0,4-25,8%), e entre sesquiterpenos, viridiflorol (0,7-3,6%). A atividade antimicrobiana e antifúngica foi investigada sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cândida albicans*, *Penicillium commune*, *Fusarium oxysporum*, *Rizoctonia solani*, e *Aspergillus flavus*, mostrando baixa atividade.

Medina (2005) investigando a composição e a atividade antimicrobiana do óleo da folha da *Anemopsis californica* utilizaram três formas de extração do óleo: destilação a vapor, microextração em fase sólida, e extração por fluido supercrítico. Trinta e oito compostos foram identificados por CG, sendo o elimiceno o componente majoritário. Enquanto a composição de voláteis da folha variaram com o método de extração, α -pineno, sabineno, β -felandreno, 1,8-cineole, piperitone, metil eugenol, (E)-cariofileno, e elimicin foram usualmente presentes em quantidades prontamente detectáveis. O óleo obtido por destilação a vapor apresentou atividade antimicrobiana sobre três (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Geotrichum candidum*) das onze espécies de microrganismos testados. Alguma dessa bioatividade pode ser atribuída ao α -pineno presente no óleo.

Noutra linha de pesquisa alguns pesquisadores tentam entender o porquê dos óleos essenciais possuírem um efeito tão forte sobre bactérias e qual sua real ação quando em contato com estas. Gill e Holley (2006) fizeram isso num trabalho onde foi investigado o rompimento das membranas celulares de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei* por óleos aromáticos. Para isso eles investigaram o papel do rompimento da membrana celular na atividade bactericida dos componentes de óleos aromáticos, eugenol, carvacrol e cinanmaldeído usando microscopia confocal a laser de varredura, mudanças nos níveis de ATP e viabilidade celular. Os resultados para eugenol e carvacrol são consistentes com a permeabilização não específica da membrana citoplásmica. Evidências para o aumento da permeabilidade da membrana são menos conclusivas. O lançamento de ATP pelas células tratadas com eugenol e carvacrol e a ausência de lançamento pelas células tratadas com cinanmaldeído podem indicar que o eugenol e o carvacrol possuem atividade inibidora de

ATPase. Os efeitos secundários também seriam consistentes com o rompimento da membrana.

Até sobre formigas é reportada a atividade dos óleos essenciais, numa pesquisa de Park e Shin (2005), foram testados a atividade inseticida dos óleos essenciais de 29 espécies de plantas sobre a formiga japonesa (*Reticulitermes speratus* Kolbe) usando um bioensaio de fumigação. Uma boa ação inseticida sobre a formiga japonesa foi conseguida com os óleos essenciais de *Melaleuca dissitiflora*, *Melaleuca uncinata*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus polybractea*, *Eucalyptus radiata*, *Eucalyptus dives*, *Eucalyptus globulus*, *Orixa japonica*, *Cinnamomum cassia*, *Allium cepa*, *Illicium verum*, *Evodia officinalis*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Cacalia roborowskii*, *Juniperus chinensis* var. *horizontalis*, *Juniperus chinensis* var. *kaizuka*, broto de cravo-da-índia, e alho aplicados numa concentração de 7,6 µL/L de ar. Destes, os óleos de cravo-da-índia e de alho mostraram as mais potentes atividades antiformigas. Análises por CG-EM permitiram a identificação dos três compostos majoritários do óleo de alho e dois do cravo-da-índia. Esses cinco compostos dos dois óleos essenciais foram testados individualmente quanto a sua atividade inseticida sobre a formiga japonesa. As respostas variaram conforme o composto e a dose, sendo o dialil trissulfito o mais tóxico, seguido por dialil disulfito, eugenol, dialil sulfito e β-cariofileno. Segundo os autores os óleos essenciais descritos merecem maiores estudos em relação ao potencial fumigante para o controle de formigas.

Segundo a literatura mundial, a pesquisa com óleos essenciais de plantas de todas as espécies, é bastante promissora sob todos os aspectos. É visível o quão importante é a atividade biológica destes óleos na inibição ou eliminação dos mais variados organismos que de uma forma ou outra atrapalham a saúde ou interesses econômicos do homem. Tal é a miríade de substâncias nesses óleos e com distintas atividades, que podemos combater desde uma simples gripe até os maiores tormentos da humanidade, como a AIDS, por exemplo. A pesquisa com estas matrizes só devem, então, ser estimuladas.

2.2.1. Processos de extração

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam de acordo com a região da planta em que ele se encontra bem como com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: enfloração (enfleurage), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

A enfloração é um método que já foi bastante utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregado para extrair óleo essencial de pétalas de flores onde as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um certo tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possui alto valor comercial. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

Na prensagem os pericarpos de frutos cítricos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

A extração de óleos essenciais com solventes orgânicos envolve o uso de compostos como o éter, éter de petróleo ou diclorometano que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

Pela extração por fluido supercrítico consegue-se recuperar os aromas naturais de vários tipos não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente e, atualmente, é um dos métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

A extração por arraste por vapor d'água é um dos métodos mais simples e mais utilizados. Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações, distinguidas pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor; a primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira; a segunda de destilação pela água e vapor, onde uma rede colocada na parte inferior de uma caldeira mais alta, separa a água da amostra e a terceira de destilação pelo vapor de água, onde a amostra é colocada em uma caldeira e o vapor de água ali injetado provém de um gerador próprio, independente. A indústria utiliza, de preferência, o vapor d'água por ser reduzido o contato com a água, relativamente aos métodos anteriores, é menos acentuada a

hidrólise dos ésteres e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

2.2.2. Aplicações dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são largamente usados em muitas indústrias para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos etc. São empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e outras. Muitos oferecem compostos de partida para sínteses de outras substâncias úteis nas indústrias químicas e farmacêuticas. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

2.2.3. Avaliação da Qualidade dos Óleos Essenciais

Problemas na qualidade de óleos essenciais podem ter origem na variabilidade da sua composição química, na adulteração ou falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem. Os produtores de grande parte dos óleos essenciais comercializados não apresentam a identificação correta da planta da qual o produto foi obtido (nome científico), a partir do vegetal que foi empregado e a procedência do mesmo. A adulteração de óleos essenciais já é conhecida desde os tempos mais antigos. Além da fraude ao consumidor, dependendo do tipo de falsificação, esta pode acarretar consequências negativas para a saúde do usuário e, portanto, especial atenção deve ser reservada a esse tipo de problema. Tipicamente, os óleos essenciais são adulterados por adição de compostos sintéticos, de baixo custo, tais como: álcool benzílico, ésteres do ácido ftálico e até hidrocarbonetos clorados; por mistura do óleo essencial de qualidade com outros de menor valor para aumentar o rendimento; por adição de substâncias sintéticas que são os compostos principais do óleo em questão; falsificação completa do óleo através de misturas de substâncias sintéticas dissolvidas num veículo inerte. Estima-se que aproximadamente 80 % dos óleos essenciais disponíveis no mercado não mais apresentam sua composição original. Sabe-se que existe uma grande variedade de estratégias sofisticadas de falsificações e, dessa forma, torna-se cada vez mais difícil detectá-las. Assim sendo, existem vários métodos que podem ser usados para realizar a avaliação da qualidade, não somente de matérias primas que contêm os óleos essenciais, como também dos próprios óleos. Dentre os métodos, podem se citados: os organolépticos, controle de pureza, análise qualitativa de seus componentes, análise do teor de

óleo volátil em drogas vegetais, métodos cromatográficos, dentre outros. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

2.2.4. Análise dos Componentes dos Óleos Essenciais

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio de técnicas de Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CG e CLAE) e Espectrométricas, dentre as quais as mais frequentes são a Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13 (RMN 1H e 13C) e a Espectrometria de Massas (EM), além do uso de bibliotecas contendo informações existentes na literatura de um grande número de substâncias já conhecidas. (SIMÕES e SPITZER, 1999).

2.3. A Pimenta da jamaica (*Pimenta dioica* Lindl)

Este condimento foi encontrado pelos colonizadores espanhóis nas terras da América Central e México e chamou atenção pelo seu aroma característico. Já era utilizado pelos povos pré-colombianos em sua cultura diária. Principalmente os Maias já a empregavam para aromatizar o chocolate e até mesmo nos processos de embalsamamento dos cadáveres dos sacerdotes devido à presença de óleos essenciais nos frutos desta espécie. Atualmente é utilizada em alguns pratos. Seu aroma é uma mistura de canela, gengibre, cravo-da-índia e noz-moscada, daí o nome em inglês all spice (todas as especiarias). Na Europa é empregado por alguns cozinheiros, e está presente, segundo alguns autores, no movimento francês conhecido por “Nouvelle Cuisine”. É uma planta de porte arbóreo, de crescimento não tão rápido, com folhas elípticas, coriácea, de coloração verde escuro, e de aroma característico da espécie, lembrando muito o cravo-da-índia, só que menos intenso quando comparado com os frutos. As flores são de pequeno porte e de coloração branca (Figura 1). Os frutos são pequenos (diâmetro $\cong$ 8 mm), de coloração escura, quase que preta quando secos, são empregados como especiarias (Figura 2). Para a destilação e obtenção de óleo essencial utilizam-se as folhas, já que este óleo é rico em eugenol, substância de grande valor comercial. Como quase todos os condimentos, possui ação digestiva e carminativa. Também é anti-séptico e por isso era empregado para conservar cadáveres e é tido como afrodisíaco. (MENEZES, 2007).



Figura 1 - Flores e folhas da pimenta da jamaica (*Pimenta dioica* L.).



Figura 2 - Frutos da pimenta da jamaica (*Pimenta dioica* L.).

A Espécie vegetal *Pimenta dioica* Lindl, conhecida popularmente como pimenta da jamaica. É uma árvore com aproximadamente 10 metros de altura (Figura 3), pertencente à

família Mirtaceae que compreende cerca de 140 gêneros e 3.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e Austrália temperada.

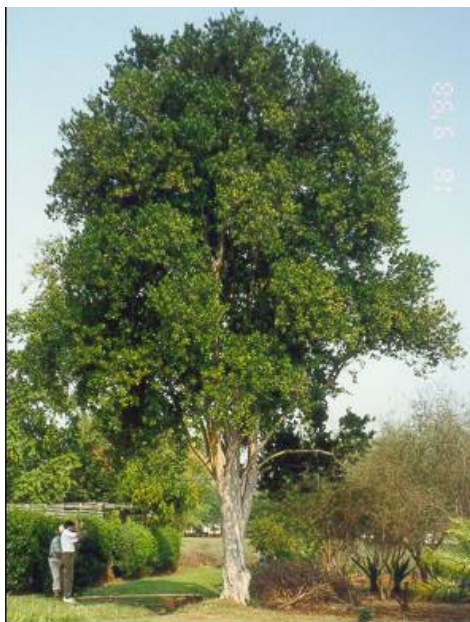


Figura 3 - Árvore da Pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica* L.).

Duke (1985) relata que esta espécie vegetal tem larga aplicação medicinal em vários países, sobretudo da América Central. Na Jamaica os frutos são utilizados no tratamento de resfriados, hemorragias e estomatites. Na Costa Rica, as folhas são usadas com funções carminativas e estomáquicas, além de serem excelentes para diabetes. Na Guatemala aplica-se externamente em escoriações e dores reumáticas. Em Cuba é utilizada como bebida refrescante, chá depurativo e estimulante tônico. Nesse país o óleo essencial do fruto é usado ainda no tratamento de diarreia, dispepsia e flatulência.

Segundo Guenther (1950) existem dois tipos de óleo de pimenta da Jamaica no mercado: o óleo destilado dos frutos, com fino odor e sabor, característico de pimenta (desta forma tem alto preço) e o óleo obtido das folhas, que apresenta qualidade inferior. Ele também relata que o fruto seco contém 2 a 5% de óleo essencial e a quantidade do óleo no fruto depende do período de colheita. O pó contém de 65 a 85% de eugenol (Figura 4) como componente majoritário, éter metil eugenol, cariofileno, felandreno, cineol, ácido palmítico, óleos fixos, resinas, açúcares, amido, ácido málico, oxalato de cálcio e taninos.

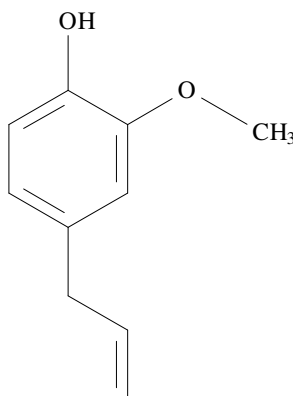


Figura 4 - Fórmula estrutural do eugenol

Ainda há poucos trabalhos publicados a respeito do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. A maioria, contudo converge para algumas conclusões comuns, a mais importante é de que é o eugenol o componente majoritário e principal responsável por muitas de suas propriedades anti-sépticas sobre vários microrganismos, corroborando esta afirmação seguem algumas pesquisas com esse enfoque recolhidas da literatura.

Rodríguez et al. (1997) avaliaram a atividade biológica de um creme do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. como repelente de insetos em tropas do exército cubano. Encontraram significativa diferença entre o grupo testado com o creme e outro com um creme placebo. Para o creme com o óleo essencial eles encontraram 100% de repelência por um tempo maior quando comparado com outros repelentes não naturais encontrados no mercado. Devido aos excelentes resultados os autores sugerem que o creme da *Pimenta dioica* pode ser empregado profilaticamente para evitar enfermidades transmitidas por mosquito, como a dengue hemorrágica, por exemplo. Neste mesmo trabalho eles comentam que outros investigadores encontraram atividade do óleo da pimenta sobre fungos e leveduras, e que como medicina popular, uma parte da população utiliza infusões desta planta para acalmar a dor menstrual sendo-lhe atribuída, também, propriedades afrodisíacas.

Lopez e outros pesquisadores (1998) estudaram o extrato da *Pimenta dioica* L. e comprovaram seus efeitos analgésico e antipirético em ratos e coelhos de laboratório. A toxicidade aguda oral também foi testada usando os mesmos seres vivos. Em comparação com o ibuprofeno o extrato da pimenta mostrou atividade antipirética e analgésica similar 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 estas 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 dióica* L. 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 outra pesquisa do mesmo autor foi pesquisada a ação de varredura de radicais de três novos galoilglucosídeos e de três compostos já conhecidos isolados a partir de frutos da *Pimenta dióica* L. Suas ações antioxidantes foram comparadas com as do α -tocoferol e do hidroxitolueno butilado (BHT) apresentando maior atividade do que os dois compostos. Os galoilglucosídeos exibiram quase a mesma atividade do ácido gálico, que é reportado como um dos mais fortes antioxidantes. (KIKUZAKI et al., 2000).

Na Universidade Federal do Maranhão (UFMA) talvez haja um dos grupos mais ativos na pesquisa com a *Pimenta dióica* L. no Brasil. Monografias, dissertações de mestrado e teses de doutorado já foram realizadas, e ainda estão sendo feitas, pesquisando a composição do óleo essencial e de sua atividade sobre microrganismos. Atualmente até a ação como aditivo em combustíveis está sendo pesquisada por doutorandos, mestrandos e graduandos desta instituição. Alguns destes trabalhos são vistos a seguir.

Em sua pesquisa de doutorado Mouchrek Filho (2000) caracterizou físico-quimicamente os óleos essenciais das folhas e frutos da *Pimenta dioica* L., iniciando assim as pesquisas deste óleo na UFMA. Neste trabalho foram usadas técnicas espectroscópicas, cromatográficas, eletroanalíticas e de análise térmica. Também foram estudadas e calibradas técnicas de extração do óleo que serviram de parâmetro para todos os trabalhos que se seguiram. Promoveu-se também a metilação e acetilação do eugenol no óleo com fins de sua utilização no controle biológico de pragas. Como acréscimo às análises convencionais que o pesquisador utilizou nesta pesquisa, ele ainda propôs e usou as técnicas de voltametria cíclica e de voltametria de redissolução anódica para quantificação do eugenol no óleo, encontrando resultados tão bons quanto os da espectroscopia UV-Vis ou de CG-EM. Usando as diferentes técnicas foi encontrado nos óleos essenciais das folhas e frutos teores de 82,0 e 86,0% de eugenol, respectivamente.

Sousa (2003) trabalhando com os frutos da *Pimenta dioica* encontrou valores muito parecidos na concentração do eugenol no óleo essencial, usando técnicas de CG e UV-Vis determinou em 85,5% a concentração deste. Como aplicação prática do óleo o autor

testou-o juntamente com um padrão de eugenol, como atrativo de insetos (feromônio) encontrando excelentes resultados no monitoramento da espécie *Eulaema cingulata* (abelha das orquídeas).

Nascimento (2004) testou a atividade antibacteriana do óleo essencial do fruto da *Pimenta dióica* L. e verificou que este apresentou uma alta atividade frente cepas de *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*, patógenos de reconhecida importância em alimentos.

Monteiro (2004) trabalhando também com o óleo essencial dos frutos da *Pimenta dióica* L. encontrou ótimos resultados de sua ação como agente bactericida. Ele testou o óleo essencial e o padrão de eugenol sobre cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Serratia* sp. e *Vibrio alginolyticus*, e comparou suas atividades com as de antibióticos de largo espectro. Na maioria das vezes a ação do óleo essencial se mostrou mais eficaz que a dos antibióticos testados.

Marinho (2005) pesquisando o óleo essencial dos frutos da *Pimenta dióica* L. e os óleos de outras duas espécies, encontrou resultados excelentes corroborando a eficácia da atividade antimicrobiana do óleo. Na comparação com os outros óleos, o da *Pimenta dioica* obteve os melhores resultados sobre *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* (isoladas de amostras de água), *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Providencia stuartii* (isoladas de amostras de hortaliças). Neste trabalho ele usou também padrões de eugenol e linalol para os testes microbiológicos.

Como se pode ver pelos trabalhos apresentados, a *Pimenta dióica* L. tem muitas propriedades úteis já descobertas e ainda por descobrir. Seu efeito antibiótico é evidente e pelo que já se descobriu muito disso se deve ao eugenol seu componente majoritário. Nesses trabalhos se destaca que, a exceção de Mouchrek Filho (2000) que não testou seus efeitos biológicos, todos utilizaram os frutos da pimenta e aí se insere a diferença deste trabalho em relação aos outros. Na presente pesquisa foi testado o óleo das folhas da pimenta, que apesar de ter menor concentração de eugenol, apresenta um melhor rendimento na extração e está disponível o ano inteiro, o que não acontece com os frutos disponíveis apenas na época da frutificação. Com os resultados encontrados neste trabalho, percebe-se que muito ainda se pode pesquisar em relação aos efeitos antimicrobianos do óleo essencial das folhas da pimenta, sua ação sobre seres da macro fauna e outras aplicações possíveis, fazem concluir que a pesquisa está apenas começando.

2.4. O Eugenol

Um parêntese especial deve ser feito em relação ao eugenol. Por ser ele o componente majoritário do óleo da *Pimenta dióica* L. (tanto de folhas como de frutos) é o responsável principal por muitas de suas atividades antimicrobianas ou antioxidantes.

O eugenol é um composto aromático que está presente no cravo, canela, sassafrás e mirra. Sua nomenclatura IUPAC é 4-alil-2-metoxifenol. (UFSC, 2007a).

Apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molecular 164. É utilizado como flavorizante (CRAVEIRO, 1981), antioxidante, antiespasmódico (MYINT, 1996), anti-séptico, agente antimicrobiano, antiinflamatório (KOBAYSAHI et al., 1997), antialérgico (KIM, 1996), na composição de cosméticos (TOURIYA, ABDELGHACHOUR e ABDELOUAFI, 1995), no tratamento da Aids (KAEMPGEN, 1990) e atrativo de insetos (REBÊLO, 2001).

Atualmente, alguns produtos obtidos por sínteses químicas, a partir do eugenol, tais como; metil eugenol e acetato de eugenila (Figura 5) adquiriram um elevado valor comercial, devido às utilizações desses produtos como princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais defensivos agrícolas, por atrativos de insetos (feromônios) e nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. (MOUCHREK FILHO, 2000).

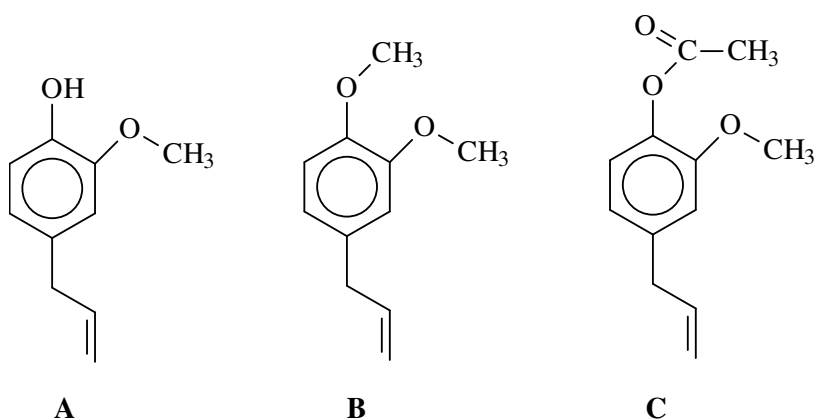


Figura 5 – (A) Eugenol; (B) Metil eugenol e (C) Acetato de eugenila.

O eugenol já foi bastante pesquisado, e várias são suas aplicações. Por exemplo, em uma pesquisa de Vázquez (2001) e outros autores, comparou-se os efeitos antifúngicos do eugenol e do timol em meios de cultura e em diferentes queijos hispânicos. Neste estudo encontrou-se um claro maior efeito inibidor do crescimento fúngico no eugenol do que no timol. Testou-se também a inibição da produção de citrinim pelo *Penicillium citrinum*,

encontrando-se excelentes resultados em praticamente todos os queijos para o eugenol, e efeitos um pouco inferiores para o timol.

Em um estudo de Rojo (2006) e colaboradores, estudou-se derivados poliméricos do “eugenol” com fins de preparo de compósitos dentais e de cimentos ortopédicos de ossos. Essa pesquisa encontrou resultados que os qualificaram sobejamente para tal fim, demonstrando quão versátil é este composto e as inúmeras aplicações que ainda estão por se descobrir. Os derivados testados também mostraram atividade antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*.

Existem outros trabalhos versando sobre a importante atividade biológica do eugenol, que isoladamente já se descobriu ser bastante efetiva. Nos óleos essenciais seus efeitos antissépticos são potencializados por outros compostos que em conjunto apresentam ação sobre a grande maioria dos microrganismos. São justificadas então, as pesquisas futuras com óleos essenciais que contenham o eugenol, ou outros compostos com propriedades parecidas. Muito ainda há para se descobrir sobre suas aplicações.

2.5. Técnicas Analíticas

Durante o desenvolvimento da química várias técnicas analíticas foram desenvolvidas, cada uma a seu tempo, desempenhou importantíssimo papel na análise das mais variadas matrizes. Na análise de óleos essenciais estas técnicas auxiliam na verificação de sua qualidade, quantificação de componentes majoritários ou não, e até na separação destes componentes para sua utilização individual. Com o desenvolvimento tecnológico estas técnicas foram se aperfeiçoando cada vez mais, chegando hoje em dia, a equipamentos acoplados a computadores que conseguem sensibilidades a nível de ppt para os mais variados fins. A avaliação quantitativa e qualitativa dos óleos essenciais envolve a utilização de diversas técnicas básicas, que passam desde a dedução de uma estrutura coerente para um dado composto de interesse, até sua quantificação. Dentre as mais utilizadas podemos citar: a Cromatografia Gasosa (CG), Espectroscopia Eletrônica de Ultravioleta (UV), Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

2.5.1. Cromatografia Gasosa (CG)

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados atualmente. Servem, também, para fins de identificação e análise

de misturas e de substâncias isoladas; nesse caso, chama-se cromatografia analítica, enquanto a cromatografia que visa ao isolamento de compostos é dita cromatografia preparativa. Diferentes técnicas cromatográficas são predominantes na análise de voláteis; em particular, métodos de cromatografia gasosa (CG) que resultam na separação da mistura em componentes individuais. Assim, a cromatografia permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais observadas nos cromatogramas. (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 1999).

2.5.2. Espectrometria na Região do Ultravioleta (UV)

O uso de técnicas complementares é de suma importância para a elucidação da estrutura de um determinado composto de interesse. Com esse fim as técnicas de espectrometria no infravermelho, ultravioleta e RMN, se complementam e permitem uma segura identificação. Visando caracterizar um composto orgânico, o químico usa, nos casos normais o IV para detectar e identificar grupos funcionais e a RMN para determinar a disposição estrutural de prótons e carbonos. Depois de estabelecido ao menos uma idéia preliminar sobre a estrutura do composto, o químico está apto a decidir se o UV será útil para caracterizar o composto. (RALPH et al., 1983).

A absorção molecular na região do UV e do Visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e leva à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em estado excitado. Para muitas estruturas eletrônicas de interesse esta absorção ocorre em uma porção acessível do UV. Na prática, a espectrometria no UV é limitada, na maioria dos casos, aos sistemas conjugados. (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1994).

2.5.3. Espectrometria Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Segundo a definição de Cirelle e Deluca citados por Falkenberg, Santos e Simões (1999), o espectro infravermelho (IV) de uma substância orgânica corresponde ao conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetida à radiação infravermelha e estas bandas correspondem às mudanças na energia vibracional dos compostos orgânicos. As frequências em que ocorrem as vibrações dependem da natureza das ligações em particular, mas são também afetadas pela vizinhança química e pela molécula como um todo. A presença de insaturações (conjugadas ou não), sistemas aromáticos e grupos funcionais específicos

pode ser verificada através da presença de bandas características, que têm grande importância na análise estrutural.

A espectrometria no infravermelho pode ser usada para obter informações acerca dos grupos funcionais da composição dos óleos essenciais, principalmente grupos contendo oxigênio, uma vez que as vibrações moleculares são perceptíveis nessa região do espectro. Apesar de ser uma técnica altamente sensível, é pouco seletiva no caso de misturas de multicomponentes e difícil para fazer medidas quantitativas de concentrações de componentes individuais. (RALPH, 1983).

A espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV) é uma das ferramentas mais comuns para a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois, com exceção de poucas moléculas homonucleares, tais como O_2 , N_2 e Cl_2 , todas as espécies moleculares absorvem radiação no IV. A intensidade de absorção é uma função da variação do momento de dipolo envolvido na vibração. (CRACKER e SIMON, 1987). Duas categorias básicas de vibrações moleculares são conhecidas: as vibrações de deformações axiais e as de deformações angulares. Uma vibração de deformação axial (estiramento) envolve uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança no ângulo entre duas ligações. O espectro IV é obtido depois que uma transformada de Fourier converte o interferograma do domínio do tempo à forma mais familiar do domínio de frequências. O interferograma é uma série oscilatória de combinações destrutivas ou construtivas, resultando de uma variação completa de comprimentos de onda. (Analytical Methods Committee, 1990).

2.5.4. Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM)

O espectro de massas (EM) de uma substância pode fornecer importantes informações relacionadas com a sua estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação. A massa molecular permite estabelecer a fórmula molecular da substância, enquanto o padrão de fragmentação pode ajudar a caracterizar a presença, bem como a localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais. O espectrômetro de massas pode ser acoplado a um aparelho de cromatografia gasosa (CG/EM), que permite tanto a identificação como a quantificação de componentes de baixo peso molecular, mesmo em misturas complexas. Essa técnica é muito utilizada para a análise de óleos voláteis. (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 1999).

Há no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusibilidade do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo. (BUDZIKIEWICZ, DJERSSAI, WILLIAMS, 1964). A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas sem a interface de enriquecimento permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados. (ADAMS, 1995).

Pode-se apresentar o espectro na forma de um gráfico ou uma tabela. O gráfico tem a vantagem de mostrar seqüências de fragmentação que com a prática podem ser facilmente reconhecidas. No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos, apresentada como percentagem do pico base (100 %), é lançada contra a razão massa/carga (m/z).

2.6. Métodos de quantificação

Na análise quantitativa são necessárias precauções em todas as etapas para minimizar ou evitar erros. A alíquota a ser analisada deve ser representativa da amostra. Em cromatografia, a etapa de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo pode acarretar erros como: adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária ou suporte, resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão de gás, quantidade de amostra injetada fora da faixa linear do detector etc. (RODRIGUES, 1996).

A concentração de uma substância na amostra pode ser determinada por um dos seguintes métodos: método do padrão externo, método da adição padrão, método do padrão interno e método da normalização. No presente trabalho, utilizou-se o método de adição padrão. Neste método, um analito de interesse dentro de uma mistura pode ser analisado pela adição de quantidades conhecidas crescente de seu padrão. Uma curva analítica é obtida e a partir da equação da reta é determinada a concentração do analito. A adição padrão é muito usada em muitas técnicas analíticas, principalmente quando a concentração do analito é muito baixa e existem efeitos de diluição em matrizes. (PINO, ROSADO e GONZALEZ, 1989).

2.7. Teste de suscetibilidade antimicrobiana pelo Método de Bauer-Kirby

O método de Bauer-Kirby tem sido amplamente usado e bem aceito ao longo de muitos anos. O procedimento, que é aceito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000), é uma modificação do método desenvolvido por Bauer, Kirby, Sherris e Turk (comumente conhecido como teste de Kirby-Bauer). Nesse teste, pequenos discos de papel de filtro de 6 mm impregnados de antibióticos são dispostos numa placa de Petri com agar Müller-Hinton nas quais as bactérias a serem testadas são cultivadas e incubadas por 24 hs em estufas a 35°C. Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento ao redor de cada disco antibiótico então são medidos. O diâmetro da zona de inibição é considerado isoladamente para verificar a suscetibilidade de cada antibiótico. Na prática, os resultados obtidos pelo método disco-placa são comparados com medidas de diâmetro de zonas, em mm, de acordo com critérios interpretativos de tabelas publicadas pelo órgão National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. (BRITANIA, 2007).

Largas zonas de inibição indicam que o microrganismo é suscetível ao antibiótico, enquanto que pequenas zonas de inibição ou ausência de zona de inibição indicam resistência por parte da bactéria, uma interpretação intermediária também é possível. Não se deve, contudo, efetuar leituras dos antibiogramas baseando-se apenas na consideração da presença ou ausência do halo de inibição. Em todos os casos deve-se levar em conta, os diâmetros dos halos, e que estes variam segundo a difusibilidade do antibiótico. Assim, um halo pequeno (12 mm) para a Colistina, antibiótico pouco difusível, representa sensibilidade, entretanto, este mesmo diâmetro para o Cloranfenicol, indica resistência. Para medir os halos, usa-se uma régua calibrada. Quando se lêem os resultados em cepas que crescem com desenvolvimento de invasores, deve-se tomar a precaução de ignorar o ligeiro véu de crescimento do invasor, medindo para ele o halo a partir de onde se tem o crescimento confluyente. Alguns antibióticos inibem o crescimento invasor, ao passo que outros não o fazem. (BRITANIA, 2007).

Quando aparecem colônias isoladas dentro do halo de vários antibióticos com diferentes mecanismos de ação (por exemplo: Cloranfenicol, Fosfomicida e Gentamicina), este halo geralmente corresponde a cultivos impuros ou a falhas no isolamento. Caso se comprove que efetivamente se trata de uma mistura, deve-se efetuar antibiogramas separados para cada um deles. Se ainda assim as colônias persistirem dentro dos halos ao redor dos discos de um só ou de vários antibióticos (por exemplo, Penicilina e Ampicilina), estes halos costumam obedecer à existência de bactérias previamente resistentes na população usada

como inóculo. A prudência, nesse caso, aconselha interpretar tais casos como resistência. (BRITANIA, 2007).

Entre as vantagens do método de difusão de disco temos: a flexibilidade dos antibióticos que podem ser testados, além da simplicidade, economia e reprodutibilidade. Porém a maior de todas suas vantagens é o fato dele fornecer informações sobre suscetibilidade/resistência de um ou mais dias mais cedo, do que seria em outros métodos.

2.8. Antibióticos

Um antibiótico é toda a substância que interfere com a capacidade das bactérias funcionarem normalmente. Pode inibir o seu crescimento (antibiótico bacteriostático) ou matar as bactérias (antibiótico bactericida). Os antibióticos são usados para tratar infecções bacterianas, que variam desde doenças quase mortais, como a meningite, a problemas comuns como o acne e a amigdalite. Não servem para curar doenças causadas por vírus, tais como constipações ou gripe. A penicilina, o primeiro antibiótico, foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming em Londres, Inglaterra. Fleming fez a sua descoberta quando observou que as bactérias não conseguiam sobreviver num prato de cultura contendo um bolor frequentemente encontrado no pão. Os cientistas passaram os anos seguintes a desenvolver o método para purificar a penicilina a partir deste bolor. No início da década de 40, a penicilina encontrava-se já disponível em larga escala. Pouco tempo depois, foram descobertos outros antibióticos. (Antibióticos, 2007).

Há diferentes maneiras dos antibióticos combaterem as bactérias. Podem, por exemplo (Antibióticos, 2007):

- ✓ Mudar a estrutura da parede celular das bactérias, as bactérias rompem-se, literalmente, devido à penetração de líquidos através da parede celular. Exemplos: penicilina (e seus derivados - ampicilina e cloxacilina), cefalosporinas (ex.: cefoxitina), vancomicina.
- ✓ Interferir na produção de proteínas necessárias a criação de novas bactérias para substituir as bactérias que estão para morrer. Alguns antibióticos interferem na capacidade das bactérias produzirem proteínas usadas para construir partes importantes da célula. Exemplos: tetraciclina, aminoglicosídeos (ex.: gentamicina, tobramicina), macrólidos (ex.: azitromicina, eritromicina, claritromicina).

- ✓ Interferir na síntese do ADN, estes antibióticos interferem na produção de novos cromossomas, a informação genética da célula. Exemplos: quinolonas (ciprofloxacina).

2.8.1. Cefotaxima

É indicada para infecções respiratórias baixas, infecção articular e óssea, infecção da pele e tecidos moles, infecção intra-abdominal, infecção gênito urinária, infecções gonocócicas. Profilaxia trans-operatória de alto risco; meningite, endocardite e septicemia. A dose e duração da terapia dependem da idade, sensibilidade do microrganismo e gravidade da infecção, e devem ser ajustados à resposta clínica do paciente, além disso, é contra-indicado para quem apresenta reações alérgicas às penicilinas e cefalosporina. (ANVISA, 2007).

Trata-se de uma cefalosporina da 3ª geração. Sua ação bactericida depende de sua capacidade em alcançar e unir-se às proteínas que ligam penicilina, localizadas nas membranas citoplasmáticas bacterianas. As cefalosporinas inibem a síntese da parede celular e do septo bacteriano, por acilação das transpeptidases unidas à membrana. Inibem também a divisão e o crescimento celular; com frequência ocorre a lise e a elongação das bactérias sensíveis. As bactérias que se dividem de forma rápida são as mais sensíveis à ação das cefalosporina.

2.8.2. Oxacilina

É indicado exclusivamente para infecções com *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina G, pneumococos e estreptococos e contra-indicado a pacientes que apresentam história de hipersensibilidade às penicilinas. A dose e duração da terapia dependem da idade, sensibilidade do microrganismo e gravidade da infecção, e devem ser ajustados à resposta clínica do paciente. (ANVISA, 2007).

Trata-se de um antibiótico beta-lactâmico pertencente ao grupo das penicilinas antiestafilocócicas, também chamadas penicilase-resistentes. Foram primariamente desenvolvidas para o tratamento de infecções por estafilococos produtores de penicilinases, sobre os quais são muito ativas. São menos ativas que penicilina G sobre organismos produtores de penicililase.

2.8.3. Vancomicina

É indicada no caso de infecções estafilocócicas em pacientes alérgicos às penicilinas ou que não respondem a elas e infecções graves, pneumonia, bacteremia, osteomielite, enterocolite, abscessos de tecidos moles. Profilaxia da endocardite bacteriana, meningite estafilocócica e estreptocócica e septicemia bacteriana, sendo contra-indicada para quem apresenta hipersensibilidade à Vancomicina, gravidez, insuficiência renal e portadores de surdez ou com perda de audição. (ANVISA, 2007).

A vancomicina é um glicopeptídeo com uma complexa e distinta estrutura química; mais que todos os outros grupos de antibióticos (são compostos de peso molecular muito elevado, sendo a estrutura central um heptapeptídio). Seu principal modo de ação é através da inibição da síntese da parede celular. Também altera a permeabilidade da membrana celular bacteriana, além de ser capaz de inibir a síntese de RNA. A vancomicina é uma droga bactericida para bactérias sensíveis, com exceção de *Enterococcus sp.*, sobre os quais são bacteriostáticos em concentrações usuais, sendo bactericidas em concentração muito elevada.

2.8.4. Sulfazotrim

A associação sinérgica das sulfas com o trimetoprim (sulfazotrim) atua bloqueando a formação dos ácidos que são necessários para a síntese das bases purinas, metionina e timina, essenciais para o metabolismo da célula bacteriana. (ANVISA, 2007).

Sulfametoxazol-Trimetoprima agem sinergicamente, bloqueando duas enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese do ácido folínico no microrganismo. São freqüentemente eficazes sobre germes que são resistentes a um deles isoladamente. Por causa de seu mecanismo de ação, o risco de resistência bacteriana é minimizado. Sulfametoxazol é uma sulfonamida de amplo espectro. É um análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico (PABA) e inibe de forma competitiva uma enzima bacteriana, a diidropteroato sintetase, que é responsável pela incorporação do PABA ao ácido diidrofolico (ácido fólico). Dessa forma, bloqueia a síntese do ácido diidrofolico e diminui a quantidade de ácido tetraidrofolico metabolicamente ativo (co-fator na síntese de purinas, timidina e DNA). Bactérias, ao contrário de células eucarióticas, não utilizam ácidos fólicos pré-formado e necessitam sintetiza-lo a partir do PABA. A ação das sulfonamidas é antagonizada pelo PABA e seus derivados (procaína e tetracaína) e pela presença de pus e detritos celulares. A Trimetoprima é uma base fraca lipofílica, com ação bacteriostática, estruturalmente relacionada com a

pirimetamina. Une-se reversivelmente à enzima bacteriana diidrofolato redutase inibindo-a. Sua afinidade a essa enzima bacteriana é até 100.000 vezes maior que pela enzima humana equivalente. Exerce seu efeito num estado da biossíntese do folato imediatamente posterior ao estado em que atua o Sulfametoxazol, ocorrendo assim uma ação sinérgica entre ambos. (UFSC, 2007b).

É indicado para infecções urinárias, prostatites, uretrite gonocócica e não gonocócica e por clamídias, sinusites, amigdalites, faringites, otites, infecções respiratórias baixas por *H. influenzae* e *Pneumococcus*, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, febre tifóide e cólera: utilizado como droga alternativa às tetraciclinas. É contra-indicado para os que têm hipersensibilidade aos componentes da fórmula, insuficiência hepática ou renal, portadores de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, porfiria, anemia megaloblástica por deficiência de folato, as grávidas, em lactação e crianças menores de 2 meses de idade. (UFSC, 2007b).

2.9. Microrganismos

As bactérias testadas são de largo espectro e foram isoladas a partir de alimentos analisados no laboratório de microbiologia do pavilhão tecnológico da UFMA, e são as seguintes: *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*

2.9.1. *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria da família Vibrionacea mesma daquelas que causam a cólera. Vive em água salgada e causa doenças gastrointestinais em humanos. O *Vibrio parahaemolyticus* habita águas litorais e está presente em concentrações mais altas durante o verão, é halofílico, ou seja, organismo dependente de sal. Quando ingerido, o *V. parahaemolyticus* causa frequentemente diarreia aguada com espasmo abdominal, náusea, vômito, febre e frio. Normalmente estes sintomas acontecem dentro de 24 horas após a ingestão. A doença é normalmente limitada a 3 dias. Doença severa é rara e geralmente acontece em pessoas com sistemas imunes debilitados. A maioria das pessoas é infectada comendo moluscos crus ou mal cozidos, particularmente ostras. Menos frequentemente, *V. parahaemolyticus* também pode causar uma infecção de pele quando uma ferida aberta é exposta a água do mar morna. Não é necessário tratamento na maioria dos casos de infecção por *V. parahaemolyticus*, também não há evidência de que tratamento antibiótico diminui a severidade ou a duração da doença. Pacientes devem beber bastante líquido para substituir os

líquidos perdidos por diarreia. Em doenças severas ou prolongadas, antibióticos como a tetraciclina, ampicilina ou ciprofloxicina, podem ser usados. A escolha de antibióticos deve estar baseado na suscetibilidade antimicrobiana do organismo. (CDC, 2007a).

2.9.2. *Salmonella sp.*

Salmonelose é uma infecção causada por uma bactéria chamada *Salmonella sp.* As pessoas infectadas com salmonela desenvolvem diarreia, febre, e câimbras abdominais, 12 a 72 horas depois da infecção. A doença normalmente dura 4 a 7 dias, e a maioria das pessoas recupera-se sem tratamento. Porém, em algumas pessoas a diarreia pode ser tão severa que há necessidade dos pacientes serem hospitalizados. Nestes pacientes, a infecção de salmonela pode se espalhar a partir dos intestinos para a corrente sanguínea, e então para outros locais do corpo e pode causar morte a menos que a pessoa seja tratada prontamente com antibióticos. Em idosos, crianças, e naqueles com sistemas imunes prejudicados é mais provável apresentarem doença severa. O microrganismo salmonela é de fato um grupo de bactérias que podem causar diarreia em humanos. São seres vivos microscópicos que passam das fezes das pessoas ou animais, para outras pessoas ou outros animais. Há muitas espécies diferentes de *Salmonella*. Como *S. Typhimurium* e *Enteritidis* que são os mais comuns nos Estados Unidos. Elas foram descobertas por um cientista americano chamado Salmon, por quem foram nomeadas. (CDC, 2007b).

As infecções de salmonela normalmente solucionam-se em 5-7 dias e freqüentemente não requerem tratamento a menos que o paciente se torne severamente desidratado ou a infecção se espalhe pelos intestinos. Pessoas com diarreia severa podem requerer reidratação, freqüentemente com fluidos intravenosos. Antibióticos não são normalmente necessários a menos que a infecção se espalhe a partir dos intestinos, então pode ser tratada com ampicilina, gentamicina, trimetoprima/sulfametoxazol, ou ciprofloxacina. Infelizmente, algumas bactérias de salmonela ficaram resistentes a antibióticos, em grande parte como resultado do uso de antibióticos para promover o crescimento da alimentação animal. A salmonela normalmente é transmitida a humanos pela ingestão de comidas contaminadas com fezes animais. As comidas contaminadas são freqüentemente de origem animal, como carne de boi, avícola, leite, ou ovos, mas todas as comidas, inclusive vegetais podem ser contaminadas. Freqüentemente muitas comidas cruas de origem animal são contaminadas, mas felizmente, o cozimento completo mata a salmonela. A comida também

pode ser contaminada pelas mãos não lavadas de um manipulador de comida infectado que esqueceu de lavá-las com sabão após usar o banheiro. (CDC, 2007b).

2.9.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli é a principal causa de doenças de origem alimentar. A infecção com *E. coli* conduz frequentemente para sangramento por diarreia, e ocasionalmente para a falência dos rins. A infecção por *E. coli* ocorre em uma variedade de modos. Embora a maior parte das doenças esteja associada com a ingestão de comida não cozida, carne de boi de chão contaminado, as pessoas também ficam doentes comendo brotos de feijão contaminados ou legumes frescos como alface e espinafre. Contato de pessoa-para-pessoa em famílias e em abrigos para crianças também é um modo conhecido de transmissão. Além disso, a infecção pode ocorrer depois da ingestão de leite cru e depois de beber ou nadar em água de esgoto contaminado. A prevenção da infecção por *E. coli* pode ser feita cozinhando a carne de boi completamente, evitando leite não pasteurizado, e lavando as mãos cuidadosamente antes do preparo e ingestão dos alimentos. Devem ser lavados bem frutas e legumes, mas apenas a lavagem pode não remover toda a contaminação. As pessoas ficam doentes por *E. coli* de dois a oito dias (média de 3-4) depois que são expostas às bactérias. A infecção por *E. coli* causa frequentemente diarreia sangrenta severa e câimbras abdominais. Às vezes a infecção não causa diarreia sangrenta ou nenhum sintoma. Normalmente pouca ou nenhuma febre está presente, e a doença se soluciona em 5 a 10 dias. Em algumas pessoas, particularmente as crianças abaixo de 5 anos de idade e idosos, a infecção também pode causar uma complicação chamada síndrome urêmica hemolítica (SUH) na qual as células de sangue vermelhas são destruídas e há a falência dos rins. A maioria das pessoas se recupera sem antibióticos ou outro tratamento específico dentro de 5 a 10 dias. Não devem ser usados antibióticos para tratar a infecção. Não há nenhuma evidência que antibióticos melhorem o curso da doença, e entende-se que o tratamento com alguns antibióticos podem conduzir a complicações nos rins. (CDC, 2007c).

2.9.4. *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas são bastonetes gram negativos, móveis, aeróbios, isolados em vários ambientes como solo, água, animais e medicamentos. Por apresentarem pouca exigência nutricional, podem crescer até em água destilada. O gênero é composto de várias espécies, dentre as quais se destaca a *Pseudomonas aeruginosa*. Elaboram vários fatores de

virulência como elastase, protease alcalina, fosfolipase C, hemolisinas, LPS e exotoxinas. São agentes frequentes de infecções hospitalares, apresentando considerável resistência aos antibióticos.

Pseudomonas sp. é uma bactéria gram-negativa que é notável por sua versatilidade ambiental, habilidade para causar infecções em indivíduos suscetíveis em particular, e sua resistência à antibióticos. Ao contrário de muitas bactérias ambientais, *Pseudomonas* sp. têm uma capacidade notável para causar doenças em hospedeiros suscetíveis. Tem a habilidade para se adaptar e prosperar em muitos nichos ecológicos, de água e solo até plantas e tecidos animais. A bactéria é capaz de utilizar uma gama extensa de combinações orgânicas como fontes de comida, obtendo com isto uma habilidade excepcional para colonizar nichos ecológicos onde nutrientes estão limitados. Esta bactéria também é notável por sua resistência para muitos antibióticos. *Pseudomonas* sp. é estudada amplamente por cientistas que estão interessados não só em sua habilidade para causar doenças e resistir a antibióticos, mas também na sua capacidade metabólica e versatilidade ambiental. (*Pseudomonas* Genoma Database v2, 2007).

Capítulo 3

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada baseou-se em testes físico-químicos para caracterização do componente majoritário do óleo essencial da folha da *Pimenta dióica* L. e em testes microbiológicos para investigação de sua ação sobre microrganismos patógenos específicos. Essa pesquisa foi realizada com a utilização de vários equipamentos e contou com a parceria dos seguintes laboratórios e instituições: Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Central Analítica, Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão, do Laboratório de Análises do Mel da Universidade Estadual do Maranhão e do Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) da USP - São Carlos.

3.1. Obtenção do óleo essencial das folhas da *Pimenta dióica* L.

3.1.1 Origem, Coleta e Preparo da Amostra Vegetal

As amostras (folhas e galhos) foram coletadas da base da copa de uma árvore de aproximadamente 20 anos de idade da espécie *Pimenta dioica* L., localizada na fazenda experimental “Santa Elisa” do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) no estado de São Paulo, em fevereiro de 2006. Essa árvore foi identificada pelo Dr. Romeu Benatti Júnior e suas exsiccatas (Figura 6) estão depositadas no herbário da Universidade Federal de São Carlos, sob o número HUFSCar: 3.652. (MOUCHREK FILHO, 2000).



Figura 6 - Exsicata da *Pimenta dioica* L, depositada no Herbário da Universidade Federal de São Carlos. Fonte: Mouchrek Filho (2000).

As amostras foram então separadas em folhas e galhos e colocadas para secar em sala seca, por um período de 7 dias quando foram então moídas.

3.1.1. Moagem do material vegetal

Após o período de secagem utilizou-se um moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340 do pavilhão tecnológico da UFMA para a trituração das folhas da *Pimenta dióica* L. Após a moagem o material em pó foi armazenado em frascos de polietileno para posterior extração do óleo essencial.

3.1.2. Extração do óleo essencial

Para a extração do óleo essencial da *Pimenta dióica* L. utilizou-se um extrator de Clevenger (Figura 7) modificado de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 ml e a uma manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada rotina de extração do óleo essencial, eram pesadas 30 gramas das folhas moídas da *Pimenta dioica* L. e colocadas com

300 mL de água destilada em balão de fundo redondo acoplado ao sistema de Clevenger. Em seguida ligava-se a manta elétrica e mantinha-se a temperatura em 100°C e após 3,5 horas encerrava-se a destilação recolhendo-se o óleo essencial. O óleo era seco por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações eram realizadas em triplicatas e as amostras eram armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração, para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Posteriormente esses óleos foram submetidos às análises.



Figura 7 – Sistema extrator de Clevenger.

O rendimento da extração foi calculado na relação massa/volume, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

3.1.3. Avaliação da Cinética de Extração do Óleo Essencial

Para a determinação da cinética de extração fez-se a hidrodestilação em sistema de Clevenger variando-se os tempos de extração em 1,0; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0 horas, à temperatura de 100 °C. Em cada extração usou-se uma massa de 30 g de amostras para 300 mL de água (1:10). A seguir mediu-se o volume do óleo, coletou-se, filtrou-se em Na₂SO₄ anidro e armazenou-se sob refrigeração para evitar perda por volatilização. Os dados da extração foram então plotados no programa Excel da Microsoft.

3.2. Características físicas do óleo essencial

As propriedades físicas do óleo essencial determinadas foram a densidade, índice de refração, solubilidade em etanol a 70% v/v, cor e aparência.

3.2.1. Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras do óleo essencial.

3.2.2. Solubilidade em etanol (70%)

Na determinação da solubilidade, utilizou-se uma mistura de álcool/água a 70% (v/v) mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes diferentes e crescentes da mistura alcoólica até se atingir a completa solubilização.

3.2.3. Índice de refração

Para a determinação do índice de refração, foram utilizadas pipetas de “Pasteur” de vidro para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, a uma temperatura de 25°C fazendo-se então as leituras. Utilizou-se um refratômetro de bancada, modelo de ABBÉ, para as medidas de índice de refração.

3.2.4. Cor

A técnica utilizada foi a visual, onde se comparou a cor do óleo essencial com cores conhecidas.

3.2.5. Aparência

Também aqui a técnica utilizada foi a visual, onde se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

3.3. Análises Químicas do Óleo Essencial

3.3.1. Análise e Quantificação por Espectrofotometria no UV-VIS

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo “Cary 50” da Hewlett Packard. Fixando-se o comprimento de onda em 280 nm, onde foram observados os picos mais definidos para as concentrações testadas do óleo, as amostras foram adicionadas em uma solução a 60% v/v de etanol/água para viabilizar a completa diluição do óleo, já que esta relação foi a que apresentou a menor proporção de etanol sem que a solução turvasse.

Para a quantificação propriamente dita do eugenol utilizou-se o método de adição padrão nas seguintes condições analíticas: adicionou-se volumes crescentes de 0, 20, 40, 60 e 80 µL de uma solução padrão de eugenol de concentração $6,4 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em cinco balões volumétricos de 10 mL contendo cada um deles um mesmo volume de 20 µL da solução mãe, essa solução foi preparada por diluição de 100 µL do óleo essencial em 10 mL de uma mistura de etanol/água a 60%, a mistura também foi usada para completar os cinco balões. A seguir mediu-se a absorbância em comprimento de onda de 280 nm, medido em relação ao branco (etanol/água).

3.3.2. Determinações Cromatográficas

O óleo essencial das folhas da *Pimenta dióica* L. foi analisado por cromatografia gasosa no cromatógrafo à gás HP-5890. Foram utilizados dois tipos de detectores para as análises, um detector de ionização de chamas para a quantificação do eugenol no óleo e um espectrômetro de massas para a identificação dos demais componentes do óleo. As condições de operação são vistas a seguir.

3.3.2.1. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Analisou-se o óleo essencial CG-EM no cromatógrafo à gás HP 5890, coluna HP - 1 de metil silicone entre-cruzada (25 m x 0,22 mm i.d.; 0,3 µm de espessura de filme), acoplado a um detector seletivo de massas HP 5970 de impacto eletrônico, com uma energia de 70 eV, temperatura de transferência de 300 °C e banco de dados NBS_Reve (40.000 registros). Para as análises foram injetados 1 µL da amostra diluída em clorofórmio e efetuaram-se as medidas fixando-se às seguintes condições: temperatura inicial: 60 °C, final:

300 °C, tempo inicial: 2 min., final: 15 min., rampa: 2 °C min.⁻¹, gás de arraste: He, solvente: clorofórmio.

3.3.2.2. Quantificação por Cromatografia Gasosa

Utilizou-se o cromatógrafo a gás HP 5890 para a determinação quantitativa do eugenol, pelo método do padrão externo, nas condições fixadas: coluna LM 100 de polietilenoglicol entre-cruzada (10 m × 0,18 mm i.d.; 0,2 µm de espessura de filme); injetor à 250 °C; detector de ionização de chamas (FID) à 300 °C; temperatura da coluna a 100 °C, com 10 °C min.⁻¹ até 190 °C; depois de 15 °C min.⁻¹ até 250 °C (1 min.).

3.3.3. Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Analizou-se o óleo essencial por IV no espectrômetro Nicolet - 5SXC FTIR, equipado com detector TGS na faixa de 4.000-400 cm⁻¹. As amostras foram analisadas diretamente em janelas de KBr.

3.3.4. Padrão

Para o presente estudo foi usado um padrão concentrado de eugenol, constituinte majoritário da *Pimenta dioica* L. Ele foi utilizado nas análises químicas realizadas e foi gentilmente fornecido pela Indústria Dierberger de Óleos Essenciais S.A.

As soluções padrão foram preparadas por diluição a diferentes concentrações em etanol e clorofórmio.

3.4. Testes biológicos usando o óleo essencial

3.4.1. Microrganismos testados

As cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* e *Pseudomonas* sp. submetidas aos testes de resistência aos antibióticos, ao padrão de eugenol e ao óleo essencial da *Pimenta dioica* L. foram isoladas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Maranhão e gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Adenilde Ribeiro Nascimento.

3.4.2. Antibiógrama

As cepas foram submetidas ao teste de suscetibilidade pelo Método Bauer-Kirby de multidiscos para antibiógramas. Este método é uma prova de difusão em discos de papel de filtro, que são embebidos em concentração de soluções contendo antibióticos e, subsequentemente, secos. Os discos utilizados para os testes de sensibilidade dos microrganismos foram adquiridos prontos junto ao comércio especializado. (BAUER et al., 1966).

Para o teste de suscetibilidade dos microrganismos mencionados no item 3.4.1 e testados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby, o procedimento foi o seguinte:

3.4.2.1. Preparo do Inóculo

Entre duas e três colônias de cada microrganismo foram selecionadas do meio sólido e repicadas separadamente em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e, em seguida, incubados em estufa a 35°C durante 24 horas até se conseguir turbidez igual ou superior a 0,5 na escala de MacFarland.

3.4.2.2. Inoculação das Placas

Semeou-se o inóculo de cada bactéria (0,25 ml), com o auxílio de swab, sobre a superfície das placas contendo Agar Muller-Hilton e neles depositaram-se discos de papel de filtro de 6 mm, impregnados com 75 µL de dois óleos essenciais extraídos das folhas da Pimenta da Jamaica, usando pinça previamente flambada. Incubou-se as placas a 37°C por 24 horas. Este mesmo procedimento também foi feito com o padrão de eugenol no lugar dos óleos essenciais.

Dos dois óleos utilizados na pesquisa, um foi extraído recentemente para este trabalho e o outro com sete anos de estocagem em geladeira da pesquisa de Mouchrek Filho (2000), doravante chamados de “óleo recente” e “óleo antigo”, respectivamente.

3.4.2.3. Antibióticos Testados

Para o teste dos antibióticos foi feito o mesmo procedimento descrito em 3.4.2.2, apenas substituindo os discos embebidos em óleo ou padrão por discos já prontos impregnados com os antibióticos. Os antibióticos testados foram os seguintes: Sulfazotrim, 10

µg/L (SUT 10), Oxacilina, 0,1µg/L (OXA 01), Cefotaxima, 20µg/L (CTX 20) e Vancomicina, 30µg/L (VAN 30). Cada disco teve o halo de inibição em sua volta medido separadamente.

3.4.2.4. Leitura dos Resultados

Após as 24 horas realizou-se a leitura dos halos de inibição com a utilização de uma régua milimetrada, para as placas contendo discos do óleo e do padrão, como também para os antibióticos. (ALZOREKY e NAKAHARA, 2003).

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados dos parâmetros físicos e químicos avaliados para o óleo essencial das folhas da *Pimenta dióica* L., também é feita uma breve discussão para cada parâmetro avaliado.

4.1. Extração do óleo essencial da *Pimenta dióica* L.

4.1.1. Cinética

Na indústria de essências a cinética de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos pesquisados, além de estar diretamente relacionado com a qualidade do óleo essencial, o tempo de extração reflete-se na natureza econômica do processo. Uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis. (MOUCHREK FILHO, 2000).

Na Figura 8 é mostrada a relação entre o rendimento percentual do óleo e o tempo de extração, para uma mesma massa de 30 g de folhas secas. No gráfico pode-se observar que o rendimento máximo do óleo extraído nas condições do item 3.1.2 foi obtido quando o tempo de extração foi de 3,0 horas, obtendo-se um volume de óleo essencial igual a 0,9 mL atribuindo-se a este valor o teor de 100%. Para tempos maiores, verificou-se uma constância nos rendimentos, provavelmente devido à diminuição crescente do óleo essencial no extrator, em decorrência da destilação.

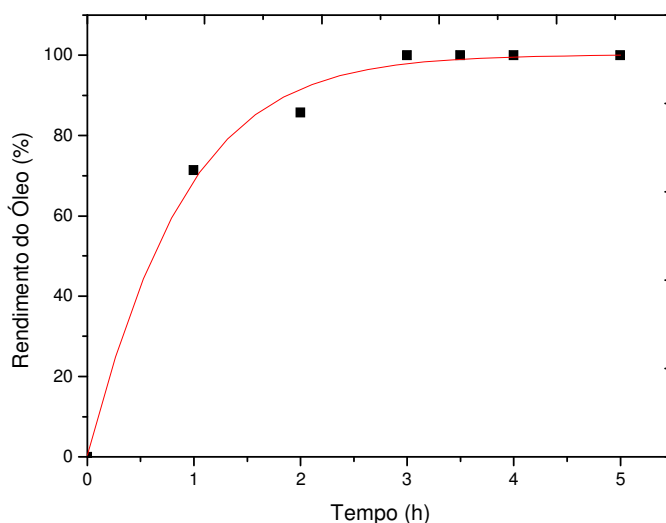


Figura 8 - Curva mostrando o rendimento de extração do óleo essencial variando o tempo de extração, com massa de amostra de 30 g e temperatura de 100 °C

4.1.2. Rendimento

O rendimento da extração pode ser calculado a partir da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma determinada massa vegetal. Como nesse experimento partiu-se de uma massa de 30 g de folhas moídas da *Pimenta dioica* L. e obteve-se em média 0,9 ml de óleo essencial em cada extração o rendimento v/m foi de 3%. Como a densidade do óleo foi determinada em 0,980 g/ml (Tabela 1) o rendimento m/m foi calculado em 2,94%.

4.2. Características Físicas do Óleo Essencial

Segundo Costa citado por Mouchrek Filho (2000) as essências alteram-se com maior ou menor facilidade, dependendo da natureza química dos seus constituintes e consoante às circunstâncias do meio. Entre os fatores principais que as modificam estão o ar, a luz, o calor, a água e impurezas diversas de origem natural ou oriundas de falsificações. As alterações podem ser reconhecidas tanto por mudanças de suas características organolépticas (aroma, cor, sabor, transparência, fluidez), como também dos valores dos seus parâmetros químicos e físicos. Desta maneira, diminuindo as suas qualidades, reduz-se de igual modo o

seu préstimo nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentos, químicas, etc. Prejuízos análogos sofrem a indústria farmacêutica, quando as utilizam como corretivo do cheiro e sabor e na terapêutica, quer pela diminuição dos constituintes ativos, quer por se tornarem agressivos quando usados externamente, causando irritações na pele.

Os parâmetros físicos dos óleos essenciais das folhas e frutos são mostrados na Tabela 1. Comparando os valores entre os óleos essenciais das folhas com os encontrados na literatura, pode-se observar que há uma similaridade entre eles, no que diz respeito à densidade, índice de refração, solubilidade em etanol a 70%, cor, aparência e rendimento, apesar de serem de espécies plantadas em ambientes diferentes.

Tabela 1 - Parâmetros físicos dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie *Pimenta dioica* L. em relação aos encontrados na literatura.

<i>Parâmetros Físicos</i>	Óleo (literatura) ^a	Óleo (literatura) ^b	Óleo folha ^c
Densidade (25 °C)	1,026	0,980	0,980
Índice de refração (25 °C)	1,530	1,521	1,521
Temperatura de ebulição (°C)	–	242	-
Rendimento de extração (%)	2,3	2,3	2,9
Solubilidade em etanol (70 %)	1:2	1:2	1:2
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido

^a Fonte: Guenther (1950).

^b Fonte: Mouchrek Filho (2000).

^c Folha usada neste trabalho e coletada em 28/02/2006.

4.3. Análises Espectrométricas do Óleo Essencial

As análises por métodos espectrofotométricos de óleos essenciais justificam-se pela necessidade de se conseguir informações sobre sua possível composição química. Nesse tipo de análise é possível indicar a presença ou ausência de determinados grupos funcionais que caracterizam, ou não, um determinado óleo essencial.

4.3.1. Análise Espectrométrica na Região do Ultravioleta

Os espectros de absorção na região do UV, para o eugenol são apresentados na Figura 9, em meio etanol/água a 60%, na ausência (A); na presença do óleo essencial (B) e do padrão de eugenol (C).

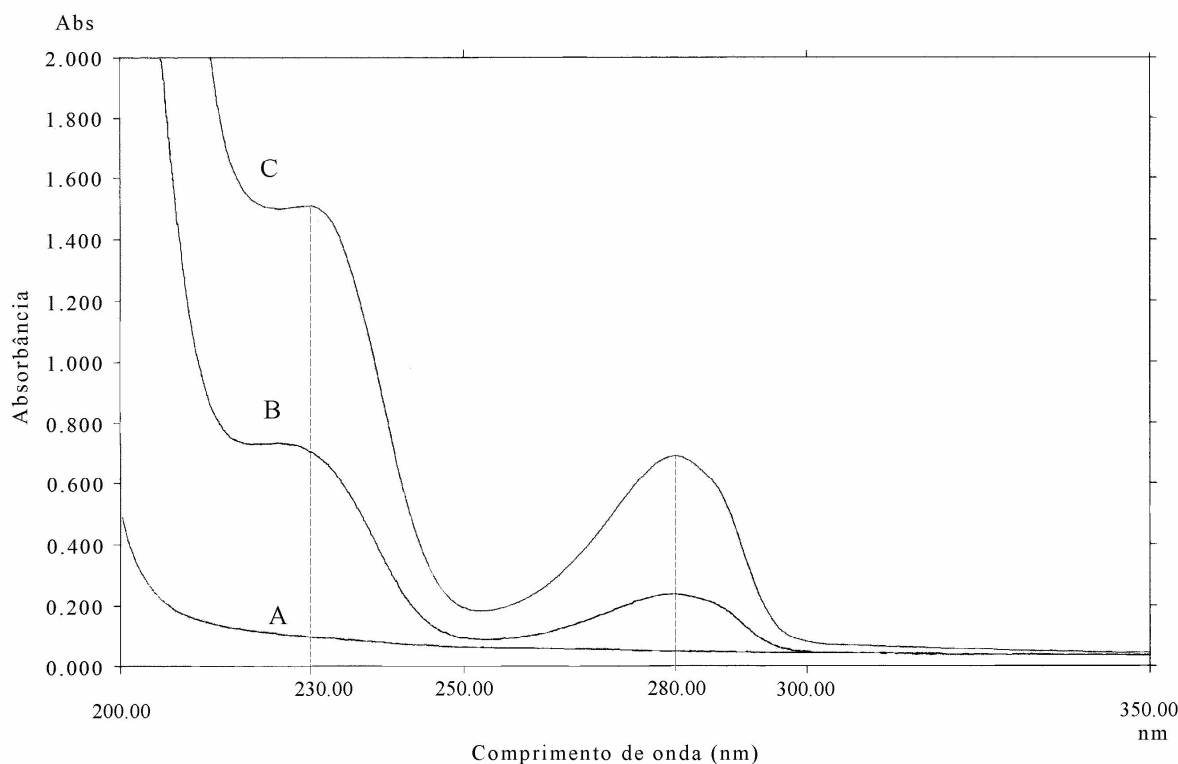


Figura 9 - Espectros de absorção no UV. A) mistura etanol/água à 60 %. B) óleo essencial (20 µL/10 mL) e C) padrão de eugenol a $2,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) foi observada nos comprimentos de onda 230 e 280 nm, com $\epsilon \sim 3 \times 10^3$, em mistura de etanol/água a 60 %, para o padrão de eugenol e são mostradas na curva C da Figura 9.

O espectro do óleo essencial é mostrado na curva B da Figura 9, com $\lambda_{\text{máx}}$ em 230 e 280 nm. Pode-se constatar que o espectro apresenta os mesmos máximos de absorbância que o padrão de eugenol mostrado na curva C da mesma figura.

Estas bandas podem ser atribuídas à presença de compostos alifáticos insaturados (230 nm) e a compostos aromáticos (280 nm), ambos apresentando transições eletrônicas

$\pi \rightarrow \pi^*$. Devido a essa correspondência pode-se concluir pela presença do eugenol no óleo essencial. (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994; UGAZ, 1994).

4.3.2. Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho

A Figura 10 mostra os espectros do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial (B) das folhas da *Pimenta dioica* na região do infravermelho. Comparando o espectro A com o espectro B observa-se que todas as bandas de absorção coincidem nas mesmas frequências.

As bandas de forte absorção nas regiões próximas de 3500 e 1370 cm^{-1} , nos espectros A e B da Figura 10, são atribuídas aos estiramentos de OH, principalmente devido à presença majoritária do eugenol, confirmado pelo padrão de eugenol (espectro A). As bandas de 2980 e 2920 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos C-H de metila e de 3100 cm^{-1} para o estiramento C-H de aromáticos. As bandas de 1270 e 1615 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos C-O da ligação C-OH, e ao estiramento C---C de aromático. Tais observações nos permite inferir, analisando estes grupos funcionais, ser o eugenol o componente majoritário do óleo essencial da *Pimenta dioica*. A Tabela 2 apresenta os principais estiramentos do padrão de eugenol e do óleo essencial da *Pimenta dioica*. (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1994).

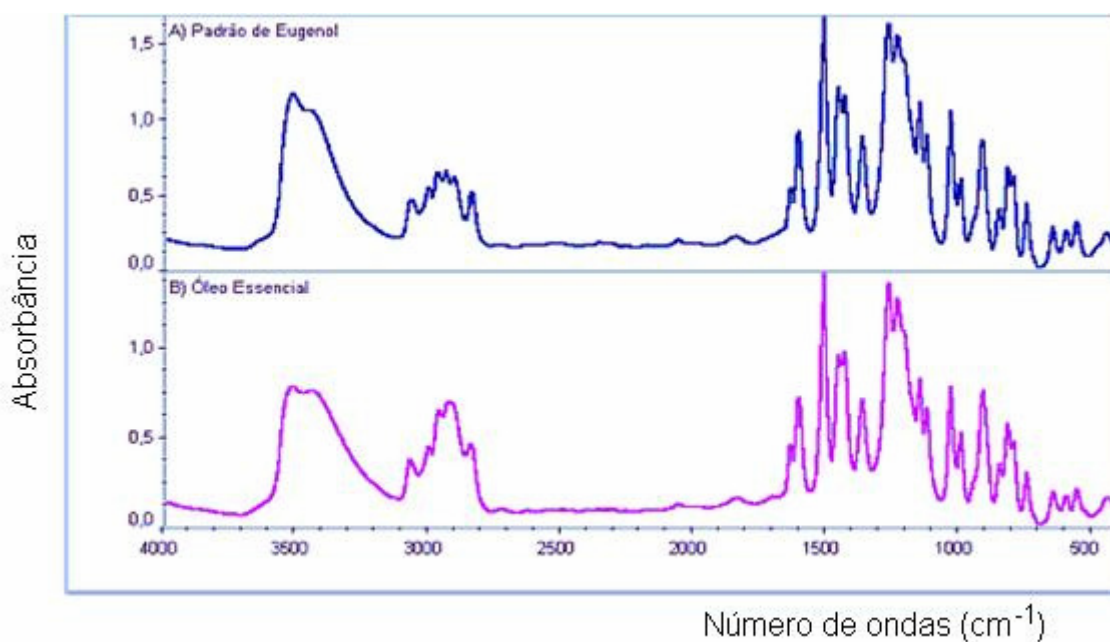
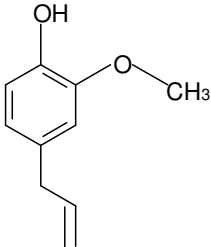
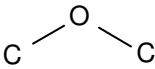
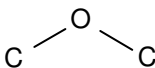


Figura 10 - Espectros na região do infravermelho. A) padrão de eugenol e B) óleo essencial.

Tabela 2 - Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do infravermelho.

Composto (eugenol)	Tipo de deformação	Grupo Funcional	Tipo de ligação	Absorção eugenol (cm ⁻¹)	Absorção óleo (cm ⁻¹)
	Axial	Hidroxila	O — H	3508,4	3513,5
	Axial	Aromático	O — H	1613,7	1613,6
	Angular Plana	Hidroxila	O — H	1369,8	1372,9
	Axial	Aromático hidroxila	O — H	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

4.4. Análises por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas

Os cromatogramas correspondentes ao óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* foram obtidos usando-se uma coluna LM 100 e estão representados pela Figura 11.

O uso da coluna LM 100 nas condições fixadas no item 3.3.2.1 apresentou a vantagem de poder ser utilizada tanto nas análises qualitativas quanto nas análises quantitativas do óleo essencial, o que proporcionou um menor tempo de análise e uma resolução ótima dos picos cromatográficos.

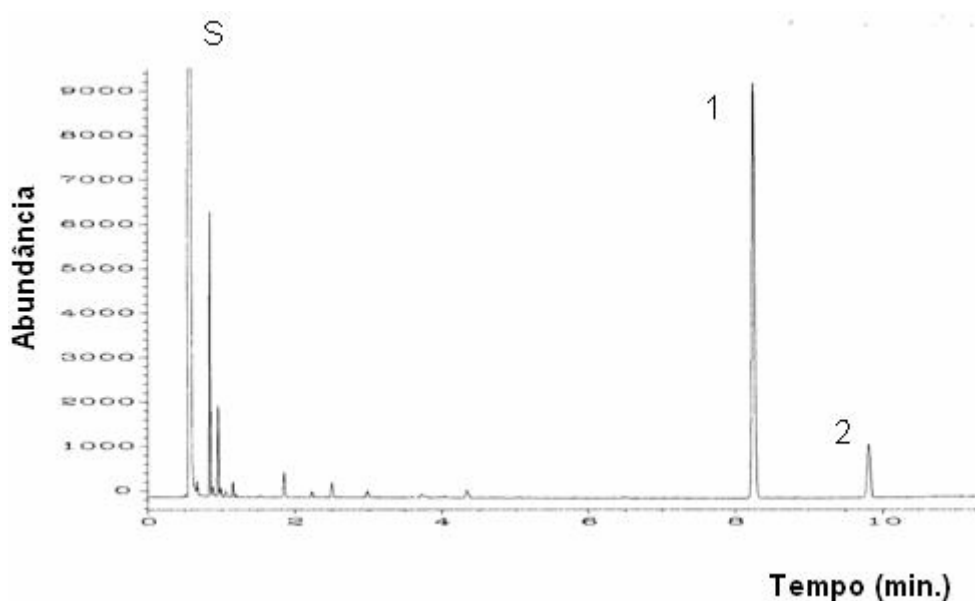


Figura 11 - Cromatograma do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica*. Condições fixadas: coluna HP-1 de metil silicone entre-cruzada (25 m × 0,22 mm i.d.; 0,3 µm de espessura de filme); temperatura inicial: 60 °C, final: 300 °C, tempo inicial: 2 min., final: 15 min., rampa: 2 °C min.⁻¹, gás de arraste: He, solvente: clorofórmio e detector seletivo de massas HP 5970 de impacto eletrônico.

O pico cromatográfico (1) com tempo de retenção de 8,4 minutos corresponde ao eugenol, o componente majoritário do óleo essencial extraído das folhas e fruto e identificado por meio dos seus espectros de massas, o pico (2) com tempo de retenção próximo a 10 minutos corresponde ao mirceno, componente minoritário do óleo, já o primeiro pico (S) corresponde ao solvente utilizado na diluição (Figura 11).

Os espectros de massas do componente majoritário dos óleos essenciais das folhas (A) e do padrão de eugenol (B) são mostrados na Figura 12.

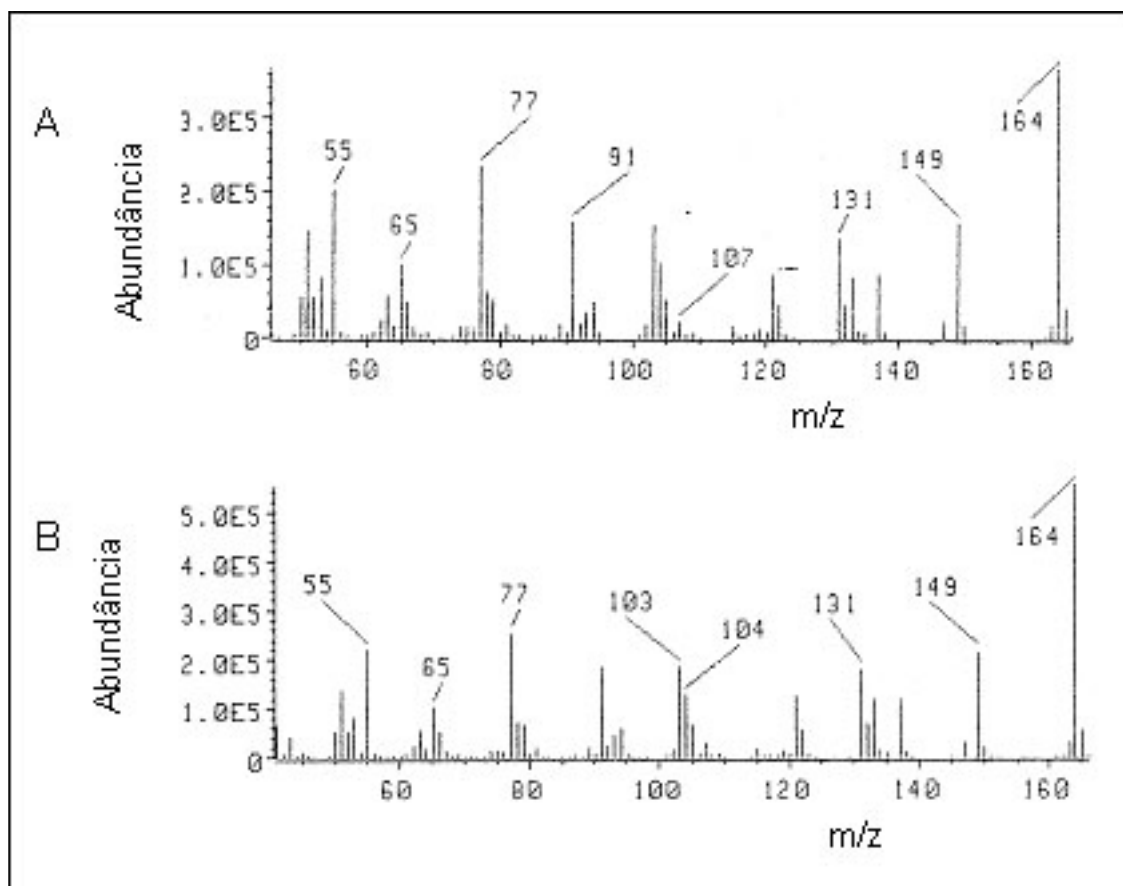


Figura 12 - A) Espectro de massas do pico cromatográfico de eugenol do óleo essencial da *Pimenta dioica*. (B) Espectro de massas do padrão de eugenol.

Os espectros de massas apresentaram, ambos, o pico do íon molecular $m/z = 164$ [M^+], confirmando como $C_{10}H_{12}O_2$ a fórmula molecular do componente (1) (Figura 12).

O pico $m/z = 149$ [$M - 15$] é característico da perda do radical metila ($CH_3\bullet$) e os picos $m/z = 91$ e $m/z = 77$, são característicos de íon tropílio [$C_7H_7^+$] e de íon [$C_6H_5^+$], respectivamente. (SYDOW, 1963).

Os principais fragmentos apresentados no espectro de massas são: 164 (100); 149 (39); 131 (32); 121 (23); 103 (34); 91 (34); 77 (46); 65 (20); 55 (39).

A comparação dos resultados obtidos pelas quebras e intensidades dos fragmentos do espectro de massas do padrão de eugenol, com o espectro de massas do óleo, permitiu identificar com segurança o eugenol como sendo o principal componente do óleo essencial da *Pimenta dioica*.

4.5. Quantificação por Cromatografia Gasosa

Para avaliar a concentração cromatográfica proposta construiu-se um gráfico registrando a concentração de eugenol pelo valor médio ($n = 3$) das respectivas áreas e interpolando-se o valor da amostra.

A Figura 13 mostra a determinação quantitativa do eugenol por CG, usando o método do padrão externo baseado no aumento da área do pico do cromatograma, em função do aumento da concentração de eugenol da solução padrão, na faixa de $6,1 \times 10^{-3}$ à $2,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ ($n=4$). A curva analítica apresentou um excelente coeficiente de correlação ($r=0,9997$). Neste método o eugenol pode ser determinado com segurança devido sua elevada concentração nos óleos essenciais, não sendo afetado pelo efeito de matriz das amostras.

Pela quantificação cromatográfica (Figura 13) pôde-se determinar o teor de eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dióica*. Na Tabela 3 é mostrada a concentração do eugenol no óleo analisado nesta pesquisa e também nos óleos obtidos por Mouchrek Filho (2000) das folhas e dos frutos da pimenta, para efeito de comparação, já que se tratam de óleos obtidos da mesma árvore.

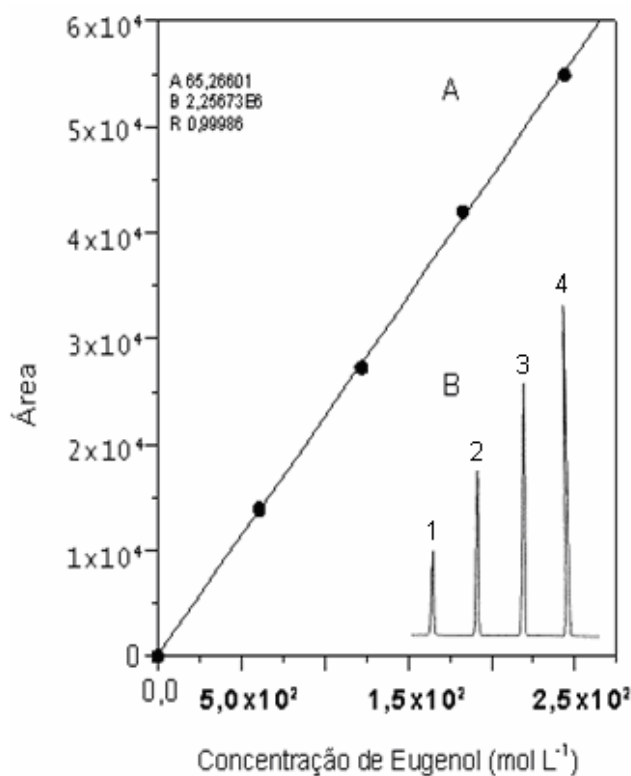


Figura 13 - A) Curva analítica e B) Picos cromatográficos para as soluções contendo concentrações de padrão de eugenol de (1) $0,6 \times 10^{-2}$; (2) $1,2 \times 10^{-2}$; (3) $1,8 \times 10^{-2}$ e (4) $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

Tabela 3 - Valores da percentagem de eugenol na composição do óleo essencial extraídos de folhas da *Pimenta dióica* L.

Amostra	Concentração de Eugenol (%)
Folhas [*]	73,6
Folhas ^{**}	77,9
Frutos ^{**}	85,9

^{*} Óleo das folhas analisado neste trabalho.

^{**} Fonte: Mouchrek Filho (2000).

A Tabela 3 mostra que o teor de eugenol encontrado por Mouchrek Filho (2000) nas folhas foi maior que o encontrado no trabalho agora realizado, apesar das folhas terem sido colhidas do mesmo exemplar, ou seja, na mesma árvore. Isso pode ser devido a diferenças de sazonalidade, que fazem com que o teor de eugenol varie segundo a época do ano e estágio que a planta se encontra. Segundo comenta o mencionado autor em seu trabalho, na época da floração a concentração de eugenol aumenta devido a seu papel durante a polinização e na defesa contra microrganismos. A concentração de eugenol das folhas encontrado no trabalho do pesquisador na verdade reflete a média de pelo menos duas coletas realizadas em épocas diferentes, o que em parte explica o porquê da diferença na concentração encontrada no trabalho atual. No trabalho de Mouchrek Filho (2000) uma coleta foi feita mais ou menos na mesma época que a deste trabalho, e a outra no período da floração, encontrando-se uma variação percentual de 8,5% de eugenol nas folhas entre as duas épocas.

No trabalho de Mouchrek Filho (2000) e no presente trabalho pode-se perceber que o teor de eugenol no óleo essencial do fruto é maior em comparação com o da folha. Em compensação os valores absolutos de extração do óleo nas folhas são maiores que os valores dos frutos. Analisando estes fatores, constata-se que a extração do óleo nas folhas é mais proveitosa do que nos frutos, já que pode ser feita o ano todo e, como se vê na Tabela 4, obtém-se 36,4% a mais de eugenol por massa de folhas.

Tabela 4 - Comparação entre os valores de eugenol nos óleos essenciais obtidos de massas constantes de folhas e frutos analisados por cromatografia gasosa.

Massa de amostra (g)	Amostra	Massa de Óleo (g)	*Massa de Eugenol (g)	Diferença (%)
100	Folhas	2,94	2,17	36,4
100	Frutos ^{**}	1,60	1,38	

^{*} Massa de eugenol calculada a partir da percentagem (m/m) no óleo.

^{**} Fonte: Mouchrek Filho (2000).

4.6. Quantificação por Espectrometria de Ultravioleta

A quantificação do eugenol no óleo essencial é mostrada na Figura 14, onde se observa a dependência da absorbância em função da concentração de eugenol.

A Figura 14 apresenta os espectros de absorção obtidos para várias concentrações de eugenol e a curva de adição padrão nos intervalos de $1,28 \times 10^{-4}$ a $5,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A determinação quantitativa do eugenol por espectrofotometria de UV foi acompanhada pelo aumento da absorção da banda do grupo aromático ($\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$), em função do aumento da concentração de eugenol no óleo. A curva de adição padrão (Figura 14) foi considerada bastante satisfatória ($r = 0,9943$) e apresentou baixo desvio padrão (0,021).

Pode-se observar que a Lei de Lambert-Beer foi obedecida em todos os intervalos de concentração e sua absortividade molar ($3 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) indica uma boa sensibilidade para os resultados.

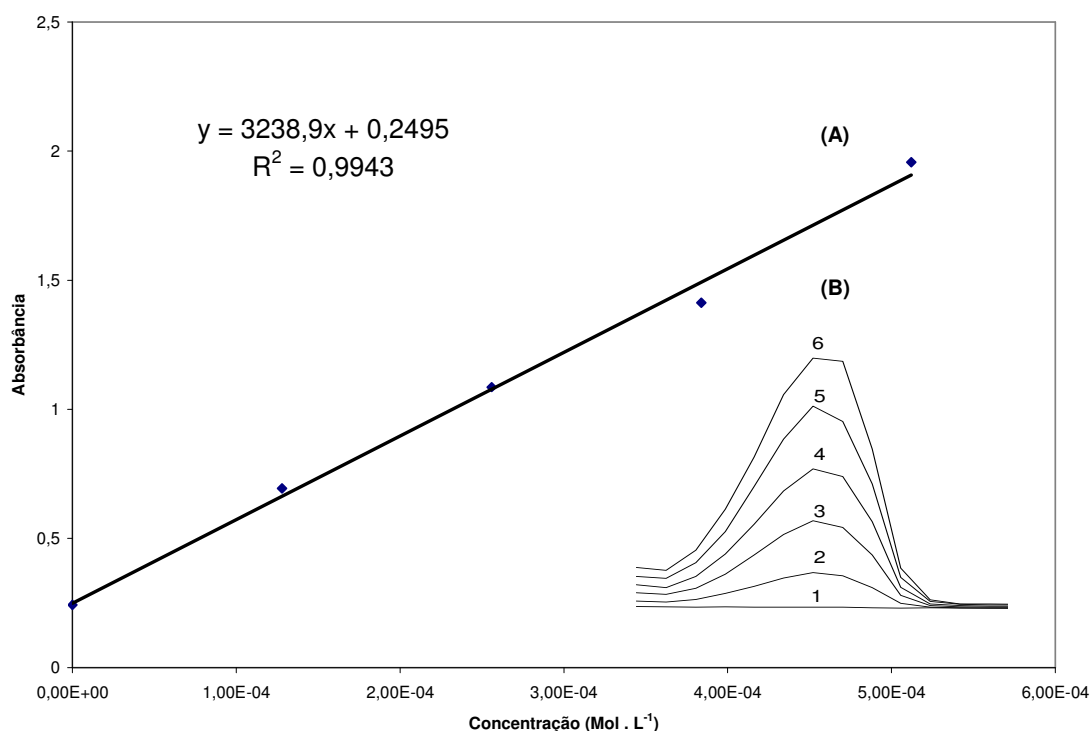


Figura 14 - (A) Curva de adição padrão de solução contendo 20 μL de solução estoque preparada com 100 μL de amostra de óleo essencial, em 10 mL de mistura etanol/água a 60 %. (B) Espectros de absorção da amostra e das concentrações de padrão de eugenol: (1) solução etanol/água 60 %; (2) amostra; (3) $1,28 \times 10^{-4}$; (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 quantificação por espectrofotometria UV utilizando a técnica de adição padrão (Figura 14) determinou-se o teor de eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* em 74,0% (Tabela 5), coletadas em fevereiro de 2006.

4.7. Comparação entre os Métodos e Técnicas Utilizados para a Quantificação do Eugenol

Comparando os resultados obtidos pelas técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, e dos métodos de curva de padrão externo e de adição padrão, foi possível avaliar a utilização dessas técnicas aplicadas às determinações qualitativas e quantitativas do eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica* L. (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre as técnicas analíticas de cromatografia e de espectrofotometria para determinação quantitativa do eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica*.

Técnica Analítica	Método Quantitativo	Amostra	Período de Coleta	Concentração de eugenol (%)	Fator de Correlação
Cromatografia Gasosa	Curva de Padrão Externo	Folhas	Fev./2006	73,6	0,9997
Espectrofotometria UV	Curva de Adição Padrão	Folhas	Fev./2006	74,0	0,9943

Como se pode ver na Tabela 5 quase não há diferença entre o que foi encontrado em eugenol nas folhas, pelas técnicas de cromatografia e espectrofotometria. Isso corrobora os resultados de ambas as técnicas, pois apesar das diferenças entre as duas, obteve-se quase os mesmos valores na concentração do eugenol.

Levando-se em conta o custo excessivamente alto de uma análise cromatográfica por corrida de análise e a simplicidade, rapidez, custo baixo de uma análise espectrofotométrica UV é possível constatar que, ao menos para a quantificação do eugenol no óleo essencial, essa última técnica demonstra-se ser a mais indicada. Em uma indústria em que o óleo essencial já está sobremaneira caracterizado, o controle de qualidade pode ser feito, sem perda de sensibilidade e precisão, por uma técnica em que o equipamento é muito barato quando comparado a um cromatógrafo a gás, de manutenção e operação muito simples e no qual os resultados não ficam atrás em qualidade analítica.

4.8. Análise da atividade bactericida do óleo essencial das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl e do padrão de eugenol

Usando o método descrito no item 3.4.2, foram testados como agentes bactericidas, o óleo essencial extraído das folhas secas da espécie vegetal *Pimenta dioica* L. e um padrão de seu componente majoritário, o eugenol.

Dois óleos essenciais extraídos das folhas de um mesmo exemplar de *Pimenta dioica* foram examinados. Um foi extraído no trabalho de Mouchrek Filho (2000) e conservado em geladeira desde então (óleo antigo), o outro foi extraído em fevereiro de 2006 para a presente pesquisa (óleo recente).

Os resultados desse procedimento foram organizados na Tabela 6 para os óleos essenciais, para o padrão de eugenol e para os antibióticos. Analisando essa tabela pode-se ver que tanto o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* L. quanto seu componente majoritário, o eugenol, inibiram em graus variados o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio parahaemolyticus*.

Tabela 6 - Atividade bactericida dos óleos essenciais, do padrão de eugenol e dos antibióticos testados.

Antibiótico	Diâmetro dos halos de inibição (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>V. parahaemolyticus</i>
Cefotaxima	16	14	21	23
Sulfazotrim	19	19	0	21
Oxacilina	0	0	0	0
Vancomicina	10	0	0	0
Óleo recente	17	14	16	24
Óleo antigo	16	15	15	16
Eugenol	16	13	13	13

Para *Escherichia coli* os dois óleos das folhas da *Pimenta dioica* apresentaram praticamente a mesma atividade (17 mm para o óleo recente e 16 mm para o óleo antigo). Isso mostra que quando bem estocado o óleo essencial mantém suas propriedades antimicrobianas mesmo passado muito tempo de sua extração. Comparado ao padrão de eugenol quase não houve diferença nas atividades, demonstrando que é realmente o eugenol o principal responsável pelo efeito bactericida do óleo. Quando comparados com os antibióticos testados os óleos mostraram atividade antimicrobiana menor apenas que a do Sulfazotrim que apresentou, mesmo assim, uma atividade muito próxima destes (Tabela 6 e Figura 15).

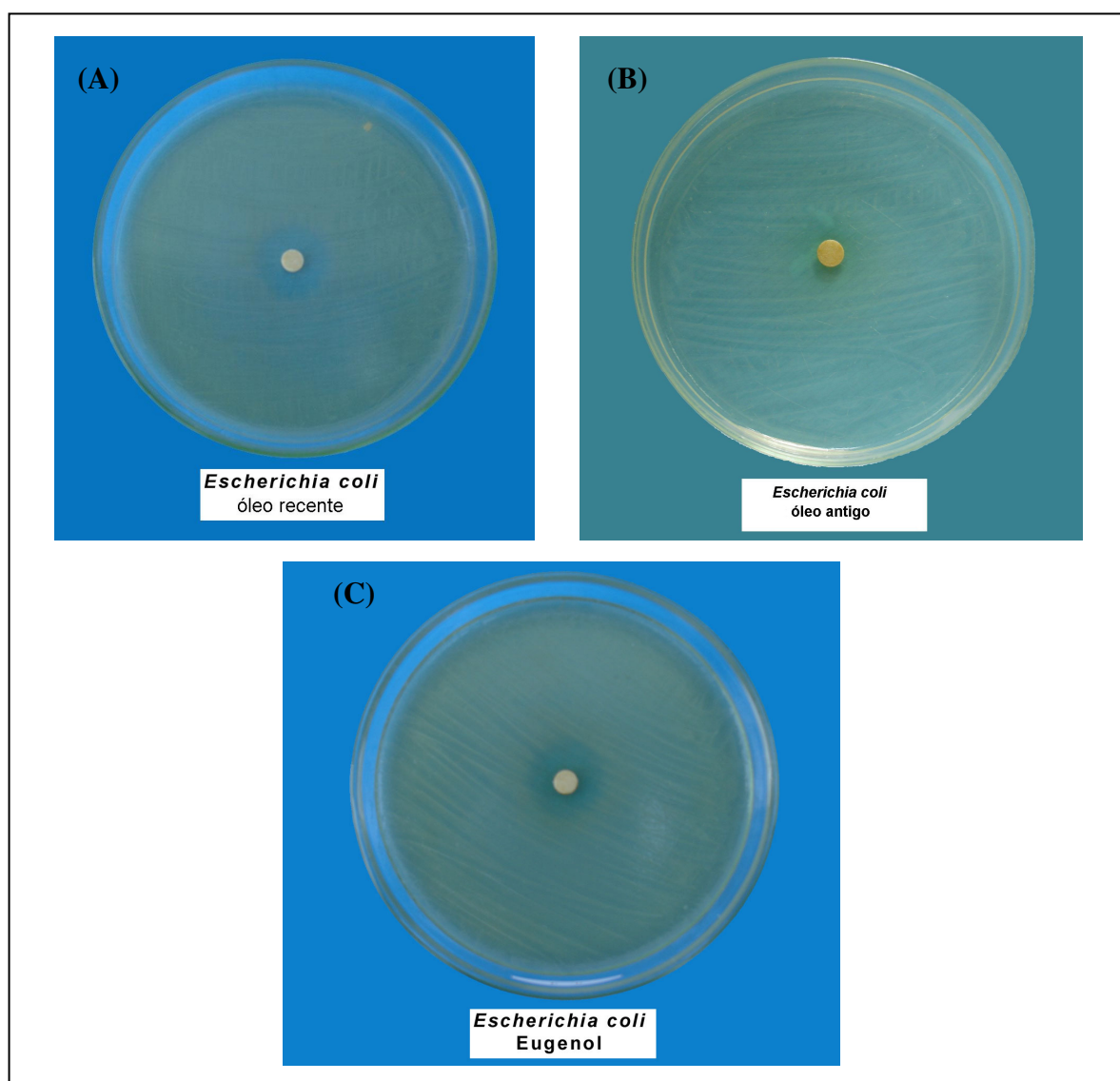


Figura 15 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *Escherichia coli* causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal *Pimenta dioica* L. e pelo padrão de eugenol (C).

Analisando-se a Tabela 6 podemos ver que para a *Pseudomonas* sp. os óleos também foram efetivos, com halo de 16 mm para o óleo recente e de 15 mm para o óleo antigo, o padrão de eugenol foi um pouco menos efetivo, com um halo de 13 mm. Portanto os óleos só foram menos ativos que a Cefotaxima. Quase não houve diferença entre o óleo antigo e o recente, tão pouco quanto ao eugenol que apresentou praticamente a mesma atividade dos óleos. Na Figura 16 é possível observar os halos formados pelos óleos e pelo padrão de eugenol.

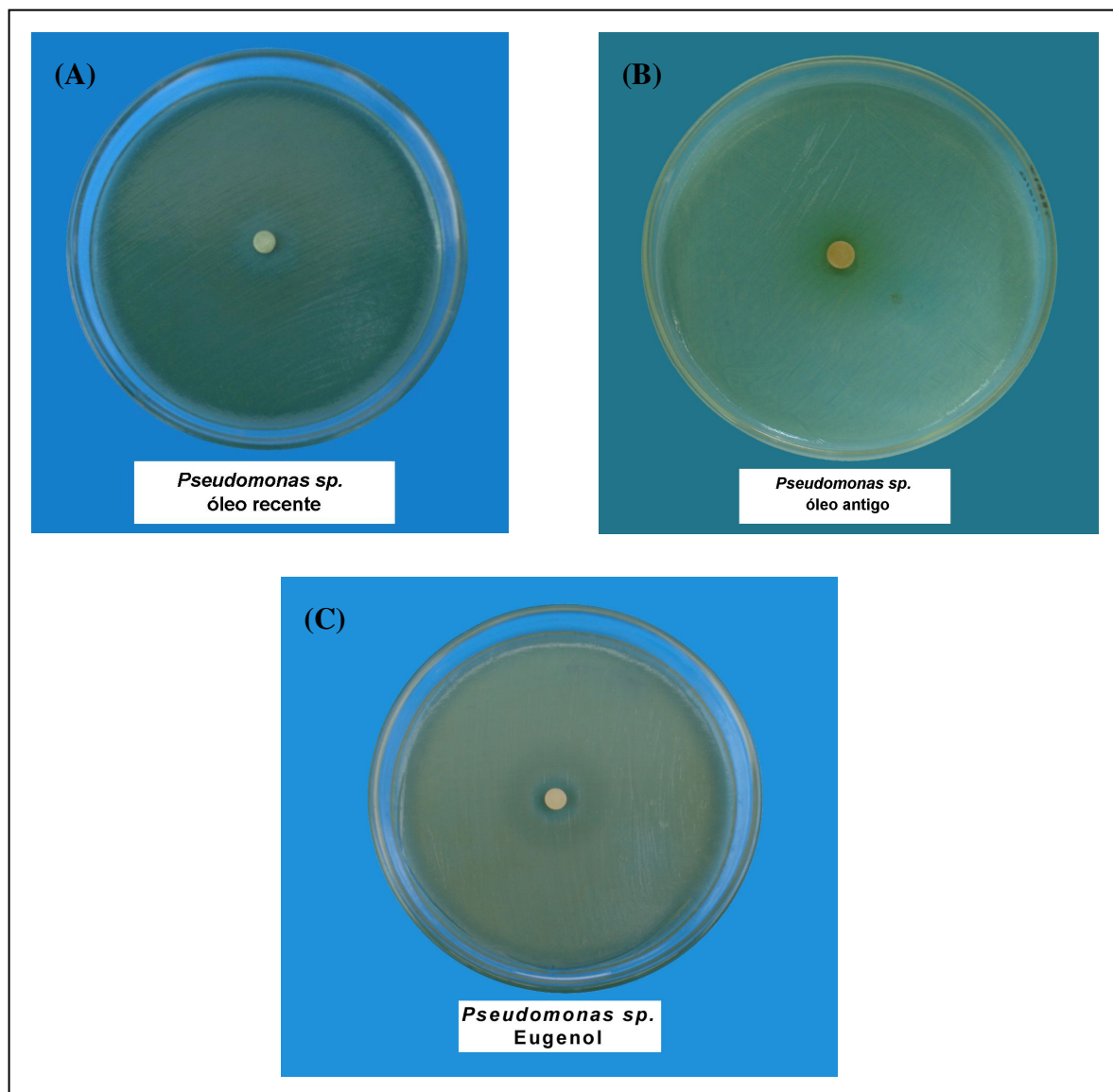


Figura 16 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *Pseudomonas* sp. causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal *Pimenta dioica* L. e pelo padrão de eugenol (C).

Já para *Salmonella sp.* os óleos também foram efetivos apresentando halos de inibição de 14 mm para o óleo recente e de 15 mm para o óleo antigo, portanto, pode-se dizer que suas atividades foram praticamente iguais. O padrão de eugenol apresentou halo de 13 mm, semelhante ao dos óleos o que corrobora mais uma vez a assertiva de ser o eugenol o principal agente no processo de inibição do crescimento bacteriano. A atividade dos antibióticos que apresentaram os melhores resultados (Cefotaxima e o Sulfazotrim) também foi semelhante ao dos óleos e do eugenol (Tabela 6 e Figura 17).

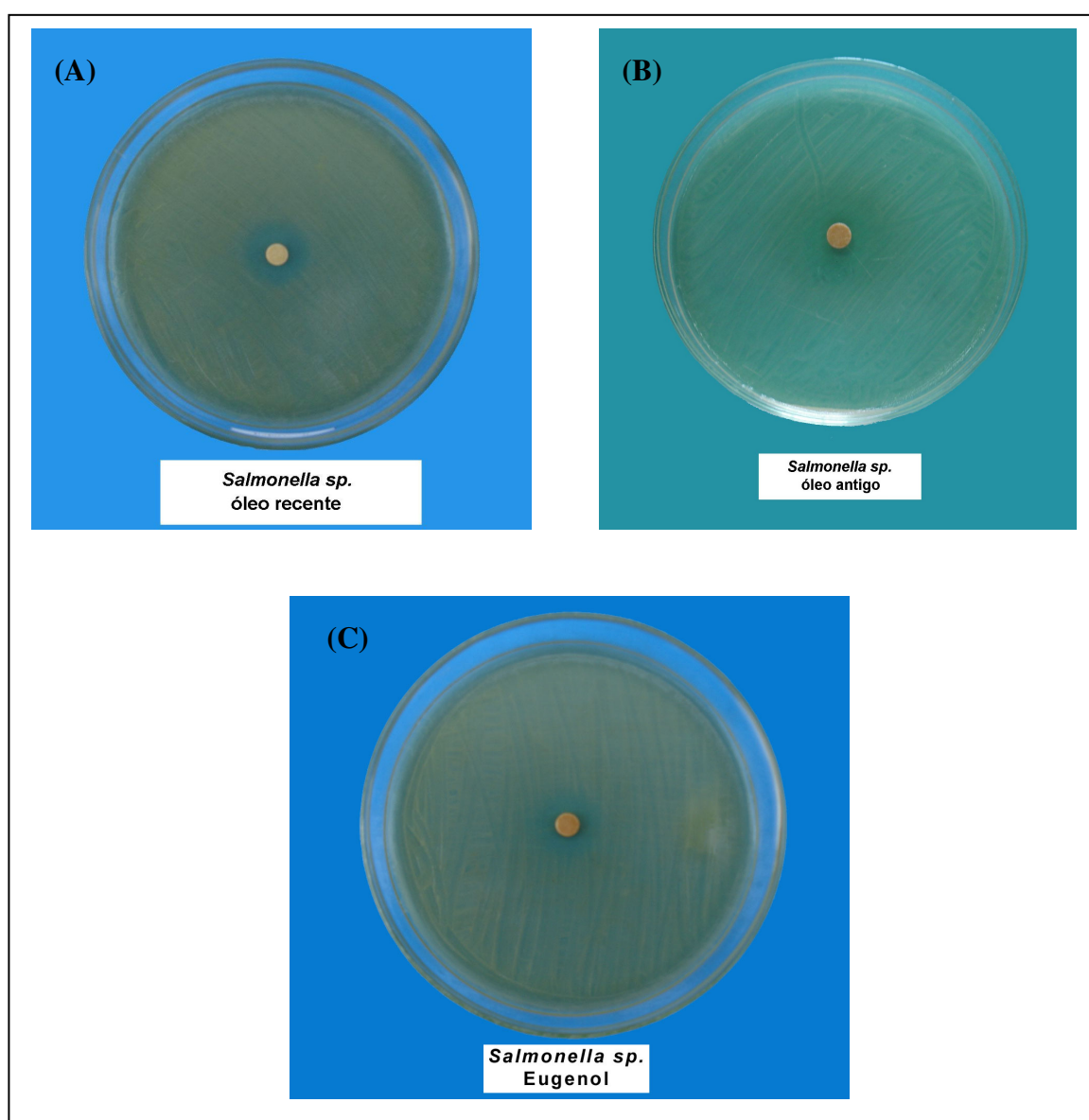


Figura 17 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *Salmonella sp.* causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal *Pimenta dioica* L. e pelo padrão de eugenol (C).

Quanto ao *V. parahaemolyticus* ocorreu uma diferença mais significativa entre as atividades dos óleos e do padrão de eugenol. O óleo recente apresentou um halo de inibição de 24 mm e o antigo de 16 mm, enquanto que o padrão de eugenol de 13 mm. Essa grande diferença entre o padrão e os óleos deve-se possivelmente a outros componentes do óleo essencial que, em conjunto com o eugenol, atuaram mais fortemente sobre a bactéria. Quanto a diferença entre a ação do óleo recente e do óleo antigo, provavelmente se deveu a perda integral ou parcial de algum componente que em conjunto com os outros favorecia a ação bactericida do óleo. Entre os antibióticos testados apenas a Cefotaxima e o Sulfazotrim apresentaram atividade sobre o microrganismo e com valores menores que os do óleo recente da *Pimenta dioica* (Tabela 6 e Figura 18).

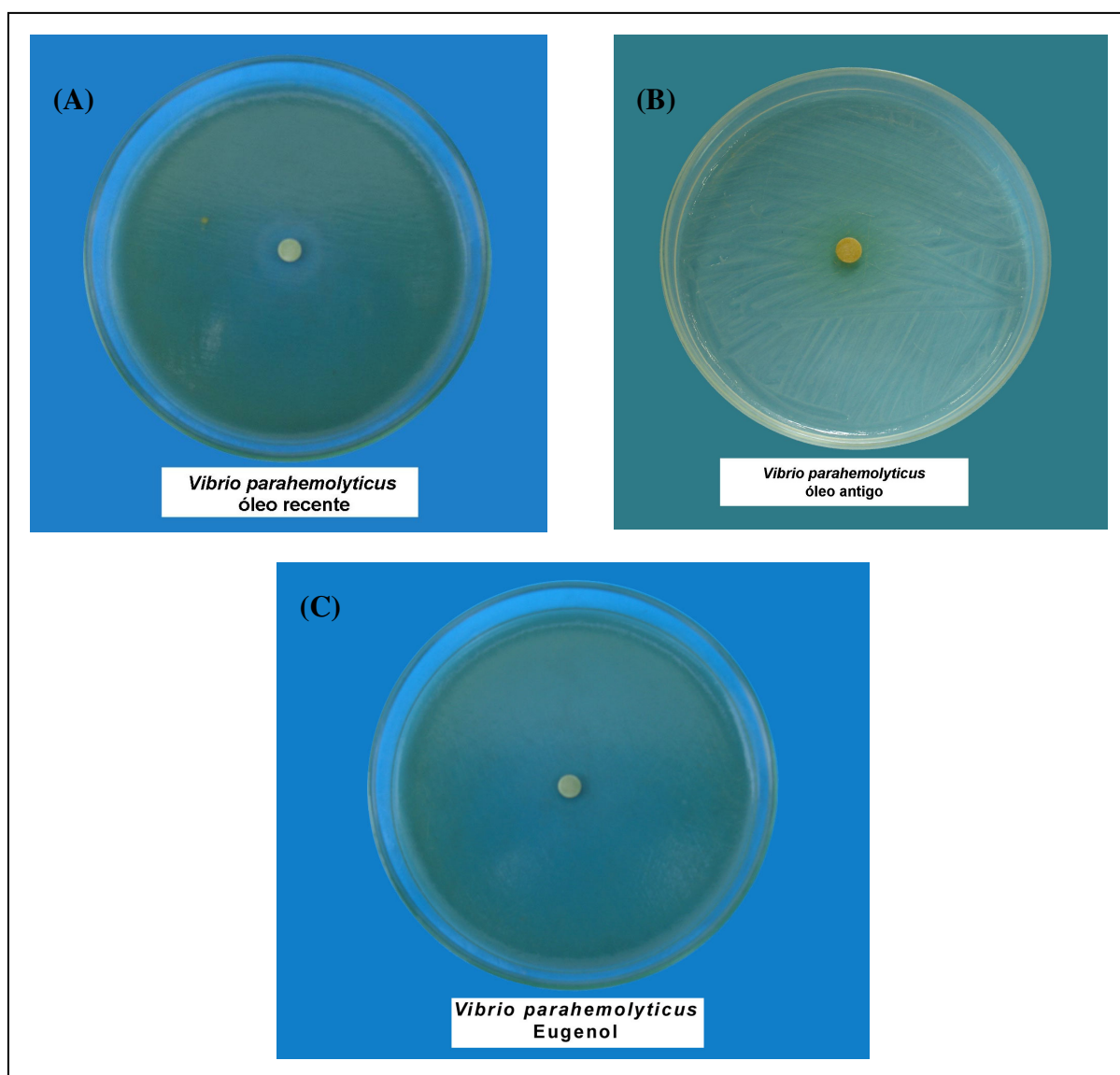


Figura 18 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *V. parahaemolyticus*, causados pelos óleos essenciais “recente” (A) e “antigo” (B) da espécie vegetal *Pimenta dioica* L. e pelo padrão de eugenol (C).

Observando-se os tamanhos das zonas de inibição de crescimento (ZIC), em milímetros, obtidos pelo Método de Difusão em Disco de Bauer-Kirby, os óleos essenciais podem ser classificados quanto à atividade bactericida como: $ZIC \geq 15$, muito ativo; $10 \leq ZIC < 15$, moderadamente ativo; $ZIC < 10$, inativo (CIMANGA, 2002). Assim, pode-se observar que o óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* L. apresentou atividade bactericida de excelente nível, apenas sobre a *Salmonella* sp. o óleo recente foi moderadamente ativo, com 14 mm de halo de inibição, muito próximo portanto, do que o classificaria como muito ativo. Foi sobre o *Vibrio parahaemolyticus* que o óleo apresentou a maior atividade, sendo mais eficaz que os antibióticos testados. Os resultados mostram que todas as bactérias testadas foram tão ou mais sensíveis ao óleo essencial que a seu componente majoritário.

A diferença entre a ação do óleo e do eugenol puro pode ser atribuída ao mirceno, componente minoritário encontrado no óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* L., que é citado na literatura possuindo efeito antibacteriano, até mesmo, na condição de minoritário. Deve-se considerar também outros fatores que implicam em grande variação na atividade anti-bacteriana, tais como: meio de cultura, técnica utilizada no teste, fonte botânica da planta, estado da planta, quantidade de óleo usada no teste, idade e técnica de isolamento dos microrganismos. (CIMANGA, 2002).

Explicando a ação do óleo da pimenta e do próprio eugenol, encontram-se na literatura, trabalhos que abordam a complexidade da composição dos óleos essenciais e de seus efeitos deletérios à membrana celular das bactérias. Em especial, a ruptura dessas membranas por compostos terpênicos que têm sido considerada para bactérias gram-positivas e gram-negativas, devido a solubilidade do óleo ou dos seus componentes. (DELAQUIS, 2002; MARINO, 2001; ÜNLÜ, 2002; HAZNEDAROGLU, 2001; HAMMER, 1999; ULTEE, 1999; HELANDER, 1998).

Analisando-se outros trabalhos feitos com a *Pimenta dioica* L. pode-se constatar que tanto o óleo dos frutos como o das folhas, são efetivos em sua ação antimicrobiana. Nos trabalhos de Sousa (2003), Nascimento (2004), Monteiro (2004) e Marinho (2005) pode-se verificar que a ação do óleo dos frutos é tão eficiente ou mais que o óleo das folhas pesquisado neste trabalho, visto ser a composição praticamente a mesma variando apenas a concentração dos componentes. Em todos esses trabalhos também foi sugerido ser o eugenol o principal responsável por essa importante ação biológica. Nesta pesquisa se trabalhou pela primeira vez com o óleo das folhas na UFMA, demonstrou-se com ela que tanto frutos como

folhas prestam-se a este tipo de utilização, com vantagens para o óleo das folhas, vantagens discutidas no item 4.5.

Os óleos essenciais como agentes antimicrobianos apresentam duas características importantes: a primeira é sua origem natural que proporciona menor perigo para as pessoas e para o ambiente, e a segunda é que eles são considerados de baixo risco para o desenvolvimento de resistência por partes dos microrganismos patogênicos. Acredita-se que é difícil para os patógenos desenvolverem resistência por se tratarem de misturas complexas de componentes com, aparentemente, diferentes mecanismos de atividade (DAFERERA, 2003). Na Figura 23 do item 4.10 é feita uma comparação entre as atividades antibacterianas dos óleos essenciais, do padrão de eugenol e dos antibióticos testados neste trabalho.

Outras pesquisas são necessárias para obtenção de mais informações sobre o uso dos óleos essenciais como bactericidas em alimentos e na medicina. Contudo, este estudo dá suporte à aplicação do óleo essencial das folhas da espécie vegetal *Pimenta dioica* L. como agente bactericida no controle dos microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* sp.

4.9. Antibiógramas

As cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* foram submetidas ao teste de resistência aos antibióticos pelo Método de Bauer-Kirby descrito no item 3.4.2.

Seguindo parâmetros estabelecidos em tabela padrão do NCCLS (2000) para comparação de antibiógramas e classificação das bactérias em resistentes (R), moderadamente sensíveis (MS) ou sensíveis (S) (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros de referência para os antibióticos testados.

Antibiótico	Concentração $\mu\text{g/L}$	Zona de inibição (mm)		
		R	MS	S
Cefotaxima (CTX)	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Oxacilina (OXA)	1	≤ 10	18-21	≥ 13
Vancomicina (VAN)	30	≤ 9	10-11	≥ 12
Sulfazotrim (SUT)	25	≤ 10	11-15	≥ 16

Fonte: NCCLS (2000)

4.9.1. Antibiógrama para o *Escherichia coli*

Os resultados do Teste de Difusão em discos para *Escherichia coli* são apresentados na Tabela 6 e Figura 19, em quais observa-se que essa bactéria, baseado nos dados da Tabela 7, é moderadamente sensível aos antibióticos Cefotaxima (CTX) e Vancomicina (VAN), pois apresentou halos de inibição de 16 mm para o primeiro e de 10 mm para o segundo, de acordo com os dados do NCCLS microrganismos que apresentam halos de 15-22 mm e 10-11 mm, respectivamente, recebem essa classificação.

Para o antibiótico Oxacilina (OXA), de acordo com o que se pode ver na Tabela 6 e Figura 19, a *Escherichia coli* mostrou-se resistente, já que não houve halo de inibição, onde o NCCLS estabelece resistência para microrganismos que apresentarem halos ≤ 10 mm para essa droga.

O único antibiótico para o qual a *E. coli* mostrou sensibilidade foi o Sulfazotrim (SUT) no qual ocorreu um halo de inibição de 19 mm, segundo o NCCLS uma bactéria é sensível a essa droga quando apresenta halos ≥ 16 mm. (Tabela 6 e Figura 19). Na Figura 23 é possível observar um comparativo entre as drogas testadas sobre a *E. coli* tendo-se uma comprovação visual da diferença entre suas atividades.

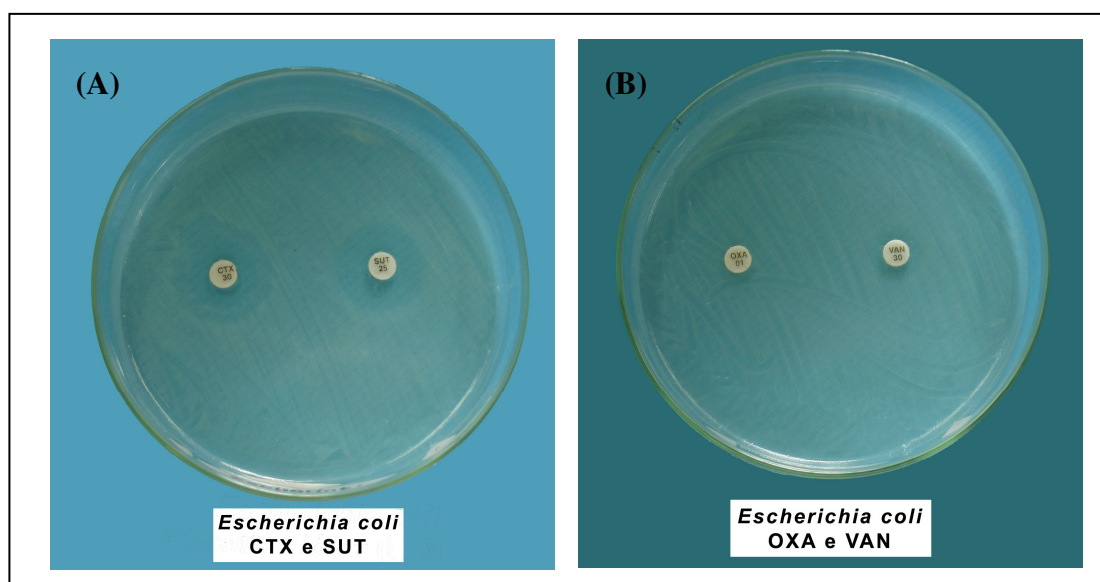


Figura 19 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *Escherichia coli* causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).

4.9.2. Antibiógrama para *Pseudomonas sp.*

Os resultados do Teste de Difusão em discos para *Pseudomonas sp.* são apresentados na Tabela 6 e Figura 20, nas quais observa-se que essa bactéria, baseado nos dados da Tabela 7, é moderadamente sensível ao antibiótico Cefotaxima, já que apresentou halo de inibição de 21 mm, de acordo com o NCCLS microrganismos que apresentam halos de 15-22 mm se ajustam a essa classificação. Dos antibióticos testados foi o que apresentou maior atividade contra essa bactéria.

A bactéria foi classificada como resistente aos antibióticos sulfazotrim, oxacilina e vancomicina, pois apresentou ausência de halo de inibição (0 mm) para todos estes, o NCCLS classifica como resistentes bactérias que apresentam halo de inibição ≤ 10 mm, ≤ 10 mm e ≤ 9 mm, respectivamente (Tabela 6 e Figura 20). Na Figura 23 é feito um comparativo das atividades dos antibióticos testados frente a *Pseudomonas sp.*

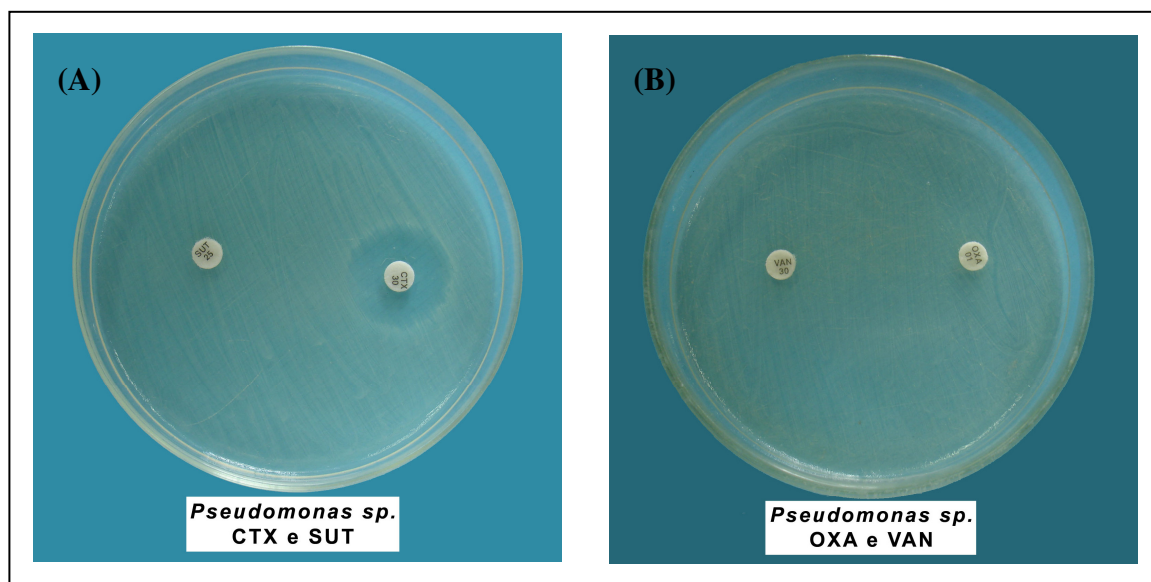


Figura 20 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *Pseudomonas sp.* causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).

4.9.3. Antibiógrama para *Salmonella* sp.

A *Salmonella* sp. usada no trabalho demonstrou sensibilidade ao Sulfazotrim, para qual apresentou halo de inibição de 19 mm, sendo que o NCCLS diz que um microrganismo é sensível a esse antibiótico, quando apresenta halo ≥ 16 mm (Tabela 6 e Figura 21).

Para os demais antibióticos: Cefotaxima, Oxacilina e Vancomicina, a bactéria mostrou resistência, apresentando halos de 14 mm, 0 mm e 0 mm, respectivamente, o NCCLS caracteriza estes antibióticos como resistentes ao apresentarem halos ≤ 14 mm, ≤ 10 mm e ≤ 9 mm, também respectivamente (Tabela 6 e Figura 21). Na Figura 23 pode-se comparar a ação dos antibióticos testados sobre a *Salmonella* sp.

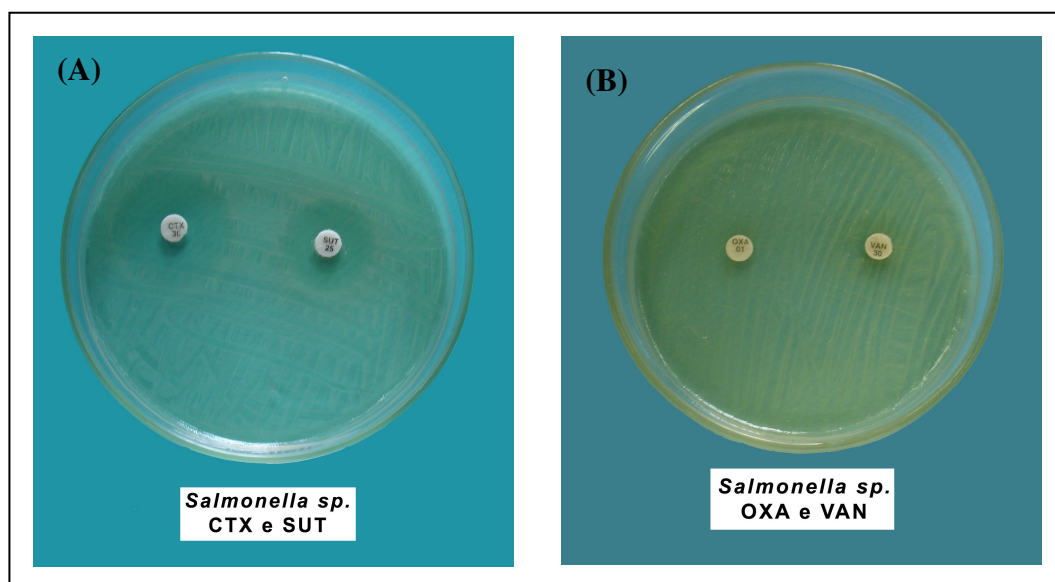


Figura 21 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *Salmonella* sp. causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).

4.9.4. Antibiógrama para *Vibrio parahaemolyticus*

O *Vibrio parahaemolyticus* mostrou sensibilidade aos antibióticos Cefotaxima e Sulfazotrim, nos quais mostrou halos de inibição de 23 mm e 21 mm, respectivamente, para esses antibióticos o NCCLS indica sensibilidade para halos de inibição ≥ 23 mm para o primeiro e ≥ 16 mm para o segundo. Nesse contexto estes antibióticos foram os mais efetivos sobre o *V. parahaemolyticus* (Tabela 6 e Figura 22).

A bactéria foi resistente aos antibióticos Oxacilina e Vancomicina pois na presença destes não se formou halo de inibição (0 mm), o NCCLS menciona resistência a esses antibióticos quando os halos de inibição são: ≤ 10 e ≤ 9 mm, respectivamente (Tabela 6 e Figura 22).

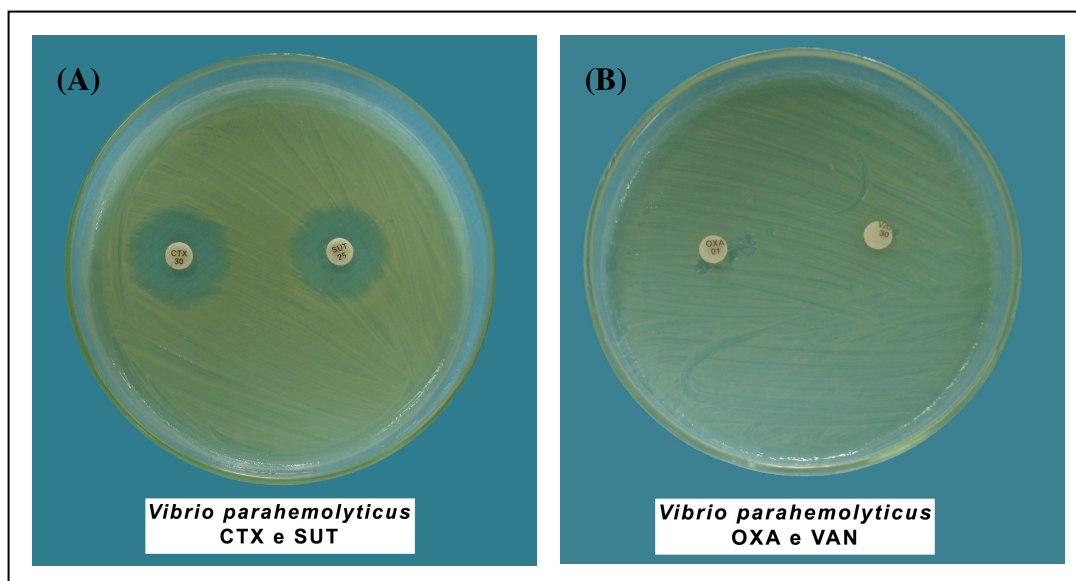


Figura 22 - Halos de inibição de crescimento da bactéria *V. parahaemolyticus* causados pelos antibióticos cefotaxima-CTX e sulfazotrim-SUT (A); e pelos antibióticos oxacilina-OXA e vancomicina-VAN (B).

4.10. Comparação entre a atividade antimicrobiana dos óleos, do eugenol e dos antibióticos testados

Na Tabela 6 e Figura 23 é possível verificar visualmente a atividade dos antibióticos testados, dos óleos e do eugenol, para as quatro bactérias estudadas neste trabalho. Na Figura 23, principalmente, observa-se que os óleos antigo e recente, ou mesmo o padrão de eugenol, sempre apresentaram alguma atividade antibacteriana para todas as bactérias testadas. Ao contrário de alguns antibióticos que para algumas bactérias não apresentaram atividade, demonstrando serem as mesmas já resistentes a tais fármacos. O único antibiótico que teve alguma ação antibacteriana para todas as bactérias foi a cefotaxima.

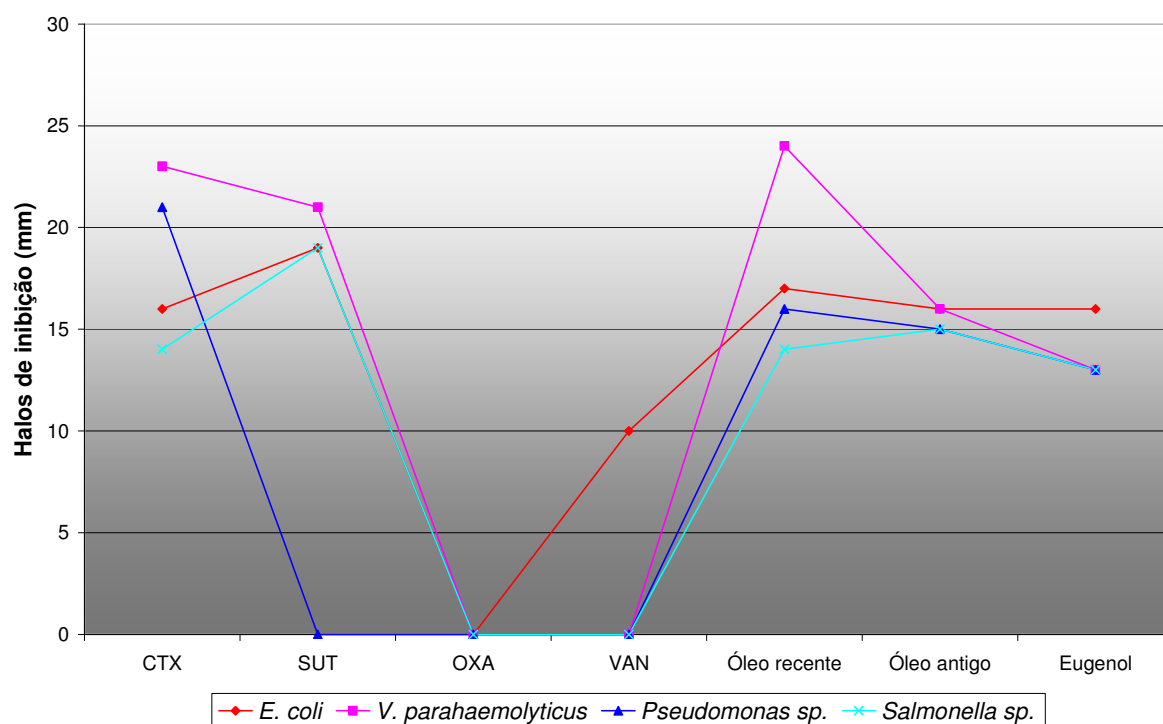


Figura 23 – Comparação dos halos de inibição dos antibióticos testados (Cefotaxima, Sulfazotrim, Oxacilina e Vancomicina), dos óleos da *Pimenta dioica* e do eugenol para as bactérias *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas sp.* e *Salmonella sp.*

Capítulo 5

CONCLUSÃO

A partir dos estudos analíticos e testes da atividade anti-bacteriana do óleo essencial das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl concluiu-se o que se segue:

- As folhas da *Pimenta dioica* L. forneceram um óleo essencial cujo rendimento foi de 3,0%, m/v, um valor considerável para extração por hidrodestilação, e a concentração de eugenol foi de 74,0%, o que demonstra ser o óleo uma importante fonte de eugenol.
- As constantes físicas do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* L. apresentaram valores semelhantes aos descritos na literatura e aos padrões usados para as suas comparações.
- Pelas técnicas espectrométricas de UV-VIS, IV e as técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, identificou-se o eugenol e o mirceno como constituintes do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* L., onde o eugenol é o componente majoritário.
- Pelo Método de Bauer-Kirby verificou-se que todas as bactérias testadas foram sensíveis ao óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* L., com uma ação tão efetiva, ou melhor, que a dos antibióticos e do padrão de eugenol testados em conjunto.
- Constatou-se que o efeito do tempo não diminui em grande parte o efeito anti-bacteriano do óleo da *Pimenta dioica* L., desde que quando bem estocado.
- Verificou-se, por fim, que o óleo essencial das folhas da espécie *Pimenta dioica* L., apresentou uma atividade antibacteriana similar ao encontrado na literatura para o óleo dos frutos dessa planta, fato compreensível já que os dois óleos possuem quase a mesma composição.

Capítulo 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados obtidos sugerem-se as seguintes linhas de pesquisa usando o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* L. para trabalhos futuros:

- Testar a atividade bactericida do óleo essencial em outros microrganismos patogênicos ao homem.
- Promover testes *in vivo* em ratos para possível aplicação farmacológica do óleo essencial.
- Fazer a metilação do eugenol, principal constituinte do óleo essencial, com o intuito de obter o metil eugenol e testá-lo como potencial feromônio de insetos (atrativo de insetos) na agricultura, ou para outros fins.
- Verificar a aplicação do óleo essencial, ou mesmo seu componente majoritário, o eugenol, em cosméticos e produtos de limpeza.
- Pesquisar a ação anti-oxidante do óleo essencial na conservação de alimentos, para possível aplicação na indústria alimentícia.
- Verificar a ação bactericida individual do mirceno sobre os mesmos microrganismos ou em outros.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Ilinois: Allured, p. 118. 1995.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **J Ethnopharmacol**, v.74, n.2, p.113-123. 2001.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Taxa of *Sideritis* from Greece. **J Agric Food Chem**, **49**, 811-815. 2005.

ALVES, R. **Filosofia da Ciência**. Introdução ao jogo de suas regras. São Paulo: brasiliense, 199p. 1988.

ALZOREKY, N.S; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **Int J Food Microbiol**, n.80, p.223-230. 2003.

Analytical Methods Committee. Aplication of Gas-Liquid Chromatography to the Analysis of Essential Oils. Part XV. Determination of "Rhodinol" in Oils of Geranium. **Analyst**, v.115, p. 459-463. 1990.

Antibióticos. Disponível em: <<http://www.antibioticos.com.pt/antibioticos.php>> Acesso em: 23 mai. 2007.

ANVISA. **Guia de Medicamentos Genéricos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/guia_genericos.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2007.

BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**. Philadelphia, v.45, p.493-496. 1966.

BRITANIA. **NUEVA DISTRIBUCIÓN DE DISCOGRAMAS BRITANIA**. Disponível em: <http://www.britanialab.com/espanol/k07_01.html> Acesso em: 23 de maio de 2007.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERSSAI, C.; WILLIAMS, D.H. **Struture elucidation of natural products by mass spectrometry**. II: Steroids, Terpenoids, Sugars and Miscellaneous class. Amsterdam: Holden-Day. 306p. 1964.

CDC. **Escherichia coli**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm>. Acesso em: 25 de maio de 2007c.

CDC. **Salmenellosis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm>. Acesso em 25 de maio de 2007b.

CDC. **Vibrio parahaemolyticus**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibrioparahaemolyticus_g.htm>. Acesso em: 23 de maio de 2007a.

CHARLES, D.J., SIMON, J.E. e WOOD, K.V. Essential Oil Constituents of *Ocimum micranthum* Willd. **J Agric Food Chem**, **38**, 120-122. 1990.

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol**, v.79, p.213-220. 2002.

CRACKER, L.E.; SIMON, J.E. **Herbs, Species and Medicinal Plants**. Phoenix: Onyx. v.1. 329p. 1987.

CRAVEIRO, A.A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: EUFC. 210p. 1981.

DADALIOGLU, I. e EVRENDILEK, G. A. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. **J Agric Food Chem**, **52**, 8255-8260. 2004.

DAFERERA, D.J. et al. The effectiveness of Plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, p. 39-44. 2003.

DELAQUIS, P.J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Int J Food Microbiol**, v.74, p.101-109. 2002.

DEMO, M; OLIVA, M; RAMOS, B; ZIGADLO, J. Determinacion de actividad antimicrobiana de componentes puros de aceites esenciales. **Higiene Alimentar**, v.15, n.85, p.87-90, jun. 2001.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 1996, 10 p. apud NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

DÍAZ, L.H.; JORGE, M.R. Actividad antimicrobiana de plantas que crescen en Cuba. **Rev. Cubana Plant Me.**, v.2, p.44-47, 2001.

DISTASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar, São Paulo: Editora da UNESP, 231p. 1996.

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**, v.16, p.623-631, 1999.

DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. Florida: CRC, 1985.

FACEY, P. C. et al. Biological activity and Chemical Composition of the Essential Oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 4774-4777. 2005.

FALEIRO, L., et al. Antibacterial and antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 8162-8168. 2005.

FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 163-179. 1999.

FRIEDMAN, M., et al. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 6042-6048. 2005.

GILL, A. O., HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, **108**, p. 1–9. 2006.

GUENTHER, E. **The essential oils**. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. New York: D. Van Nostrand, v.4. 1950.

HAMMER, K.A. et al. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-999. 1999.

HAZNEDAROGLU, M. Z. et al. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. **Fitoterapia**, v.72, p.829-831. 2001.

HELANDER, L.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.3890-3595. 1998.

IACOBELLIS, N. S., et al. Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 57-61. 2005.

KAEMPGEN, D. FED. REP. GER. Eugenol-isoeugenol mixtures para treatment of Aids. Ger. Offen. De 3829200 A1. Mar 1, 1990.

KIKUZAKI, H. et al. Galloylglucosides from Berries of *Pimenta dioica*. **J. Nat. Prod.**, **63**, p. 749-752. 2000.

KIKUZAKI, H. et al. Antioxidative phenylpropanoids from berries of *Pimenta dioica*. **Phytochemistry**, **52**, p. 1307-1312, 1999.

KIM, J., MARSHALL, M. R. e WEI, C. Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 2839-2845. 2005.

KIM, S. et al. Inhibition of immediate allergic reaction by eugenol. **Yakhak Hoechi**, v.40, n.6, p.679-683. 1996.

KOBAYSAHI et al. Eugenol and isoeugenol dimmers as bactericides, fungicides and inflammation inhibitors. **Kibun Food Chemica Co., Ltd.**, Japan. JP 09176074 A2. Jul. 8, 1997.

KORDALI, S. Screening of Chemical Composition and Antifungal and Antioxidant Activities of the Essential Oils from Three Turkish *Artemisia* Species. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 1408-1416. 2005.

KORDALI, S. et al. Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracunculus* and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential Oils. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 9452-9458. 2005

LEMOS, T.L.G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research.**, **4**, 82-84. 1990.

LETESSIER, M.P., SVOBODA, K.P. e WALTERS, D.R. Antifungal activity of the Essential oil of Hyssop (*Hyssopus officinalis*). **J. Phytopathology**, **149**, 673-678. 2001.

LOPEZ, 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.** v.32, n.3, p.198-203. 1998.

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, 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Maranhão. 2005.

MARINO, M. et al. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.187-195. 2001.

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**, 3926-3929. 2005.

MEDINA, A. L. Composition and Antimicrobial Activity of *Anemopsis californica* Leaf oil. **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 8694-8698. 2005.

MENEZES Jr., A. **Pimenta da Jamaica: *Pimenta dioica* L.** Disponível em: <<http://www.jperegrino.com.br/Fitoterapia/pimenta.htm>> Acesso em: 25 abr. 2007.

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.** (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004.

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. 124p. Tese (Doutorado) – IQSC, USP. 2000.

MYINT, S. et al. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. **J. Chromatogra.**, v. 679, p.193-195. 1996.

NASCIMENTO, A. R. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*).** Lavras. 2004, 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2004.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard – 70 ed. NCCLS documents M2-A7. Pennsylvania, 2000.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 13. 1999.

OXENHAM, S.K., SVOBODA, K.P. e WALTERS, D.R. Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). **J. Phytopathology**, **53**, 174-180. 2005.

PARK, I.-K. e SHIN, S.-C. Fumigant Activity of Plant Essential Oils and Components from Garlic (*Allium sativum*) and Clove Bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese Termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **J. Agric. Food Chem.**, **53**, 4388-4392. 2005

PINO, J.; ROSADO, A.; GONZALEZ, A. Analysis of the essential oil of pimento berry (*Pimenta dioica*). **Nahrung**., v.33, n.8, p. 717-720, 1989.

Pseudomonas Genoma Database v2. ***Pseudomonas aeruginosa***. Disponível em: <http://www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp>. Acesso em 25 de maio de 2007.

RALPH, L.S. et al. **Identificação sistemática de compostos orgânicos.** Manual de Laboratório. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p. 367-378. 1983.

REBÊLO, J.M.M. **História natural das euglossíneas.** As abelhas das orquídeas. São Luís, Lithograf, 152p. 2001.

REIS, M.S. dos; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, M.O., et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 51. 1999.

RODRIGUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Pimenta dioica*. **Alimentaria**, v.33, n.8, p. 107-110, 1996.

RODRÍGUEZ, M.G.Q; SARRÍA, F.B; VALCÁRCEL, A.C; SALVADO, A.C. Uso de la crema repelente de *Pimenta dioica* por combatientes de una unidad militar. **Rev. Cubana Med. Milit.** v.26, n.2, p. 94-97. 1997.

ROJO, L.; et al. From natural products to polymeric derivatives of “Eugenol”: a new approach for preparation of dental composites and orthopedic bone cements. **Biomacromolecules**, **7**, p. 2751-2761, 2006.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 291-320. 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 387p. 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 387-415. 1999.

SOARES, A.C. Se bem não fizer, mal também não fará. **Revista Eletrônica de Ciências**. n.12, out. 2002. Disponível em: < http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html> Acesso em 18 abr. 2007.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. *J. ethnopharmacol.*, v. 51, p. 1-15, 1996 apud NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

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. 2003, 99f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.

SRINIVASAN, D; NATHAN, S; SURESH, T; PERUMALSAMY, P.L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. n.74, p.217-220, 2001.

SYDOW, E.V., Mass Spectrometry of Terpenes II. Monoterpene Alcohols. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 17, n. 9, p. 2504 - 2512, 1963.

TEPE, B., et al. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Various Extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 1132-1137. 2005.

TOURIYA, B., ABDELGHAMOUR, T.E., ABDELOUAFI, I. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sci. Aliments**, v.15, n.6, p.571-578, 1995.

TUBEROSO, C. I. G. et al. Chemical composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Antifungal Activities of the Essential Oil of *Achillea ligustica* All. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 10148-10153. 2005.

UFSC. **Extração de Eugenol: destilação por arraste de vapor**. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/organica/index.html>>. Acesso em: 15 mai. 2007a.

UFSC. **Farmacologia Sulfametoxazol + Trimetoprima**. Disponível em: <<http://www.ccs.ufsc.br/farmacia/TCCGenericos/Sulfametoxazol/Farmacologia.html>>. Acesso em: 23 mai. 2007b.

UGAZ, O. L., **Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales**. Lima, Fondo Editorial de la Pontificia de la Universidad Católica del Perú, p. 23-42. 1994.

ULTEE, A. et al. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environment Microbiology**, v.65, p.4606-4610. 1999.

ÜNLÜ, M. et al. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.117-121. 2002.

VALERO, M. e GINER, M. J. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, **108**, p. 1–9. 2006.

VÁZQUEZ, B. I. et al. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, **67**, p. 157-163, 2001.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol**, v. 51, p. 239-254, 1996 apud NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

WILLIAMS, David G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle Press, 334p. 1996.

World Health Organization. **WHO traditional medicine strategy**. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/index.html>> Acesso em: 18 abr. 2007.