

Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica*

Paulo Roberto Barros Gomes^{1*}, Joelkson Diniz Ribeiro³, Myrcéia Carlyne Guimarães da Costa², Marcelo Werneck da Silva Castro², Nagib Buzar Neto², Andréa Vasconcelos Melo³, Gustavo Oliveira Everton³, Hilton Costa Louzeiro⁴, Maria Alves Fontenele⁵, Helson Souza de Lima³, Eduardo Fonseca Silva³, Maria do Livramento de Paula⁶, Victor Elias Mouchrek Filho³, Adenilde Nascimento Mouchrek³

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Paragominas, PA, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, 68440-000 Abaetetuba, PA, Brasil.

³Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

⁴Universidade Federal do Maranhão, Campus Pinheiro, MA, Brasil.

⁵Coordenação de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, 65915-240, Imperatriz, MA, Brasil.

⁶Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Farmácia, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

*Autor para correspondência: prbgomes@yahoo.com.br

Recebido: 11 de maio de 2020

Revisado: 16 de junho de 2020

Aceto: 18 de junho de 2020

RESUMO

Neste estudo descrevemos a extração, composição química e a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído dos frutos da *Pimenta dioica*. Para isso, extraímos o óleo por hidrodestilação; identificamos os compostos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM); quantificamos o componente majoritário por espectrometria UV-vis e voltametria; e determinamos a atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera* pelo método de difusão em disco. Os resultados mostraram que o óleo é composto em sua maioria por eugenol e sua quantidade está em, aproximadamente, 78,15%, cuja classe predominante foi a dos monoterpenos. Além disso, as bactérias testadas com o óleo essencial apresentaram halos de inibição, variando de 11 a 21 mm. Portanto, o óleo é um potencial agente antibacteriano.

Palavras-chave: Eugenol, hidrodestilação, compostos voláteis, *Pimenta dioica*, bactérias.

SUMMARY

Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from fruits of *Pimenta dioica*

In this study we describe the extraction, chemical composition, and antibacterial activity of the essential oil extracted from fruits of *Pimenta dioica*. For this, we extracted the oil by hydrodistillation; we identified the compounds by Gas Chromatography coupled to the Mass Spectrometer (CG/MS); we quantified the major component by vis-UV Spectrometry and Voltammetry; and we determined the antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Serratia odorifera*, using the disk diffusion method. The results showed that the oil is composed mostly of eugenol and its quantity is approximately 78.15%, whose predominant class was that of monoterpenes. In addition, the bacteria tested with the essential oil showed inhibition halos, ranging from 11 to 21 mm. Therefore, the oil is a potential antibacterial agent.

Keywords: Eugenol, hydrodistillation, volatile compounds, *Pimenta dioica*, bacteria.

INTRODUÇÃO

As bactérias patogênicas de origem alimentar despertam o interesse na busca de agentes antibacterianos. Os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que uma em cada dez pessoas adoecem quando ingerem alimentos contaminados e 420 000 vêm ao óbito a cada ano. Entre os principais fatores responsáveis por esses resultados estão as doenças transmitidas por bactérias e o processo de deterioração alimentar [1-3].

Para conter este processo, a indústria de alimento utiliza os agentes antibacterianos sintéticos. No entanto, apesar destes possuírem eficácia no controle de surtos destas doenças, suas aplicações provocaram acúmulo de resíduos no meio ambiente, resistência bacteriana aos produtos químicos aplicados e efeitos colaterais na saúde humana [4, 5]. Além disso, outra desvantagem está na preocupação dos consumidores com os efeitos colaterais a médio e longo prazo e com a segurança destes produtos. Dentro desta perspectiva, os pesquisadores precisam buscar novos agentes antibacteriano [6]. Logo, uma alternativa viável está nos estudos de produtos de origem natural, especialmente os óleos essenciais, devido a sua alta biodegradabilidade e baixa toxicidade para os mamíferos [7].

Os produtos extraídos de plantas, sejam extratos ou óleos essenciais, sobretudo da *Pimenta dioica*, possuem aplicações em alimentos, na medicina tradicional e em

algumas atividades biológicas. Originária da América Central, principalmente da Jamaica e Cuba, esta planta é utilizada como condimento justamente pelo seu aroma e sabor picante. Por conta disto, a indústria de alimentos o utiliza não só para realçar sabor, mas também como conservante de carnes, devido a sua capacidade antioxidante [8].

Na medicina tradicional os extratos obtidos da folha são utilizados no tratamento da flatulência e diarreia, já os frutos pulverizados são empregados no trato de calos, neuralgia e reumatismo [8]. No que diz respeito às atividades biológicas, observamos relatos da utilização do óleo como antioxidante e citotóxico contra algumas linhagens de câncer [9], moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* [10], acaricida [11], antibacteriano em alimentos [12,13], larvicida e adulticida contra *Aedes aegypti* [14], antirradical [15] e antifúngico contra *Fusarium oxysporum* e *F. verticillioides* [16]. Apesar das inúmeras aplicações, no que diz respeito à atividade biológica, observamos que a maioria dos estudos se concentram mais em extrair o óleo a partir das folhas do que frutos. Devido a esta condição, neste estudo descreveremos a extração, composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos da *P. dioica* (L). Merr e do padrão do constituinte majoritário desse óleo.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e extração do óleo essencial

A coleta dos frutos foi realizada na Cooperativa Agrícola Mista do Projeto Onça LTDA, município de Taperoá-BA, Brasil, em agosto de 2005, recebendo o certificado orgânico pelo Instituto Biodinâmico (IBD) de número CA0212/05. Após a coleta, a secagem foi feita através de ventilação natural, posteriormente os frutos foram triturados no moinho elétrico (Tecnal, modelo TE-340) e armazenados em recipientes de polietileno. Extraímos o óleo por hidrodestilação e calculamos o rendimento médio a partir das medidas de densidade e do peso do material bruto. Para isso, pesamos 30 gramas das amostras e misturamos em 300 mL de água destilada. Em seguida colocamos esta mistura em um frasco de fundo redondo de 1000 mL e o acoplamos ao extrator de Clevenger sob aquecimento de 100 °C em uma manta elétrica por 3,5 h. Após esse tempo, o óleo destilado foi coletado e seco por percolação em sulfato de sódio anidro. Realizamos essas operações em triplicatas e armazenamos as amostras em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Medimos a densidade a partir de um picnômetro a 25 °C.

Análise cromatográfica CG/EM

Identificamos os componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em um cromatógrafo a gás da marca Varian 2100,

acoplado a um espectrômetro de massa por impacto de elétrons e analisador de *ions trap*, utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 mL.min⁻¹; temperatura do injetor: 270 °C, split 1:50; coluna capilar (15 m x 0,25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100% metilsiloxano 0,25 µm) e programação de temperatura do forno de 60 a 200 °C com taxa de aquecimento de 8 °C.min⁻¹, e de 200 e 290 °C, com taxa de aquecimento de 15 °C.min⁻¹. Noespectrômetro de massas, as temperaturas do main fold ion trap e da linha de transferência foram de 50, 190 e 200 °C. Injetamos alíquotas de 1 µL (injetor automático CP-8410) das amostras diluídas na proporção de 20 µL em 1,5 mL de hexano. Identificamos os componentes do óleo a partir da comparação destes com os dados obtidos de substâncias autênticas existentes em bibliotecas de referência a partir do tempo de retenção.

Solução tampão e padrão

Utilizamos o tampão Britton-Robson (BR) em todos os experimentos eletroquímicos, onde foi ajustado ao pH desejado uma solução NaOH 1,0 mol L⁻¹. Preparamos o tampão a partir de ácido bórico 0,04 mol L⁻¹, ácido fosfórico 0,04 mol L⁻¹ e perclorato de sódio 0,10 mol L⁻¹, o que resultou numa solução de pH 1,8. O perclorato de sódio tinha a função de manter a força iônica na casa de 10⁻¹.

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

Determinações voltamétricas e espectroscópicas UV vis para quantificação de eugenol

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato, modelo CV50W, da Bioanalytical Systems, acoplado aos eletrodos e a um computador para captura dos dados, além de uma célula eletroquímica de vidro de 10 mL contendo tampa com entradas para os eletrodos e um agitador magnético. O eletrodo de trabalho utilizado (área = 0,06 cm²), o de referência e o eletrodo auxiliar foram, respectivamente, de carbono vítreo, prata em solução de cloreto de prata (Ag/AgCl) e platina. O eletrólito suporte usado foi uma solução etanol/tampão BR pH 3,3 a 55%.

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

Para a quantificação por espectroscopia UV-vis, realizamos os testes em comprimento de onda de 280 nm e com as amostras diluídas em solução de etanol/água destilada a 60% (v/v). A quantificação do eugenol foi determinada pelo método da adição padrão. Para tanto, foram utilizados cinco balões volumétricos de 10 mL (contendo cada um 20 μL da solução estoque do óleo essencial), nos quais foram adicionados individualmente volumes crescentes da solução estoque do padrão de eugenol (0, 20, 40, 60 e 80 μL); sendo, em seguida, aferidos com a solução etanol/água destilada a 60%. A absorbância das novas soluções assim obtidas foi lida, tendo como branco a solução de etanol/água. Os espectros de absorção observados, assim com a curva de adição padrão, foram obtidos por várias concentrações de eugenol no intervalo de $1,28 \times 10^{-4}$ a $5,12 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} em solução de etanol/água a 60%.

Testes da atividade antibacteriana

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

Avaliamos a atividade antibacteriana do óleo essencial e do padrão de eugenol a partir do método de difusão em disco recomendado pela *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) [17]. Inoculamos as culturas bacterianas em caldo BHI (Brain and Heart Infusion) e após 24 h de incubação a 37 °C, procedemos a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (108 microrganismos mL^{-1}). Posteriormente, semeamos o inóculo de cada cultura bacteriana (0,10 mL) com swab estéril na superfície das placas contendo ágar Mueller Hinton solidificado, e sobre a mesma foram aderidos, com auxílio de uma pinça previamente flambada, pequenos discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados, individualmente, com 75 μL do óleo essencial e com o padrão (eugenol), sendo pressionados levemente sobre a superfície do meio. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e os halos de inibição foram medidos em uma régua milimetrada, certificada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Testamos o comportamento das cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera* frente à ação de antimicrobianos comerciais seguindo o método de difusão de disco [17]. Os discos impregnados com os antimicrobianos foram distribuídos nas placas com o auxílio de uma pinça previamente flambada, sendo em seguida levemente pressionados contra a superfície do meio. Na sequência, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Os antimicrobianos utilizados foram escolhidos pela sua eficácia ao respectivo microrganismo conforme recomendação da CLSI [18], sendo estes: tetraciclina (TET 30 µg), vancomicina (VAN 30 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), ampicilina (AMP 10 µg), cloranfenicol (CLO 30 µg), eritromicina (ERI 15 µg), gentamicina (GEN 10 µg), sulfazotrim (SUT 25 µg) e penicilina (PEN 10 µg).

RESULTADOS

Extração do óleo, análise cromatográfica GC/EM, UV-vis e voltametria de pulso diferencial

Extraíndo o óleo pela técnica de hidrodestilação, obtivemos um rendimento médio e densidade média, respectivamente, 2,16 % (m/m) e 0,968 g mL⁻¹. Da análise cromatográfica, identificamos a presença de 17 compostos, o que observamos no cromatograma (figura 1), onde o majoritário foi o eugenol e o minoritário o α -cariofileno, enquanto a classe predominante foi a dos monoterpenos, com 90,77% (tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos componentes presentes no óleo essencial.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Desvio padrão	Área normalizada (%)
1-Octen-3-ol	2,15	0,04	1,40
β -pineno	2,33	0,08	6,52
α -pineno	2,49	0,00	0,28
<i>o</i> -cimeno	2,66	0,04	1,94
Limoneno	2,77	0,05	4,09
Linalol	3,56	0,02	0,64
<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	4,64	0,01	0,22
α -terpineol	4,80	0,01	0,13
5-indanol	5,76	0,20	5,88

(Continue)

Tabela 1. Identificação dos componentes presentes no óleo essencial.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Desvio padrão	Área normalizada (%)
Eugenol	7,23	0,32	76,98
α -Cubebeno	7,80	0,01	0,35
Cariofileno	8,41	0,00	0,09
α -Cariofileno	8,90	0,00	0,08
γ -muroлено	9,22	0,01	0,25
α -cadineno	9,58	0,00	0,19
α -muroлено	9,74	0,01	0,22
δ -cadineno	9,88	0,01	0,76
Álcool			1,40
Fenol			5,88
Monoterpenos			90,77
Sesquiterpenos			1,94

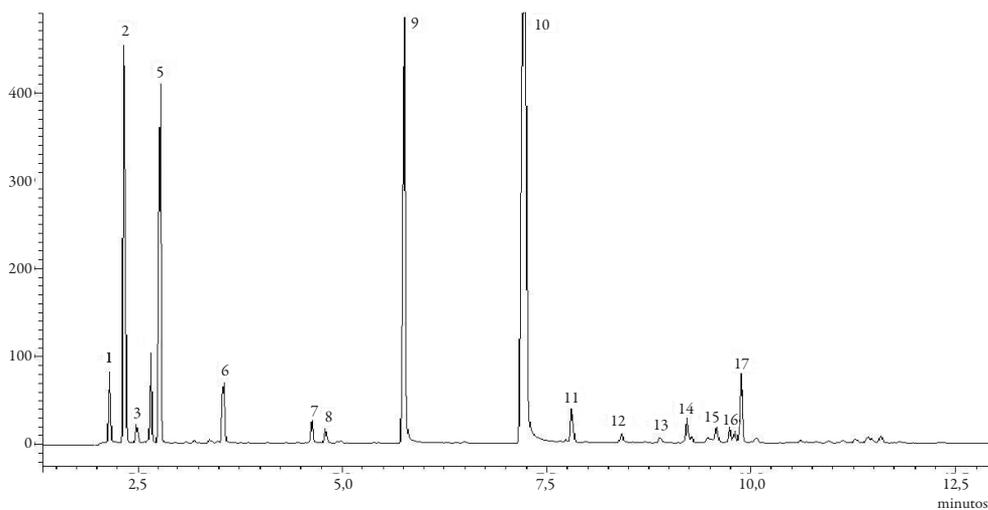


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

No entanto, ao quantificarmos o eugenol pela técnica de adição por padrão por espectroscopia de ultravioleta (UV-vis) e por voltametria de pulso diferencial, observamos pouca diferença nos valores. Da análise espectroscópica, constatamos que o eugenol estava presente em uma quantidade de 78,15% (figura 2) enquanto este valor foi de

74,63% na voltametria (figura 3). Por fim, na figura 4, mostramos o comportamento eletroquímico do padrão eugenol e do óleo essencial enquanto na figura 5 observamos os voltamogramas de pulso diferencial da amostra e do padrão de eugenol.

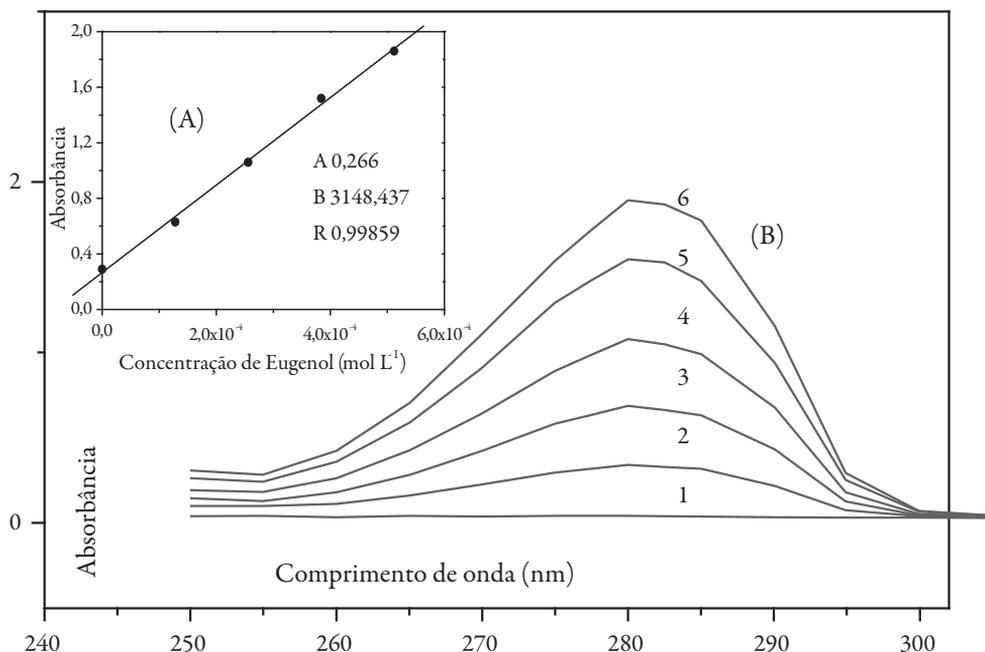


Figura 2. Determinação quantitativa do eugenol por espectroscopia de UV foi acompanhada pelo aumento da absorção da banda do anel aromático ($\lambda_{\text{máx}}=280\text{nm}$), em função do aumento da concentração do eugenol no óleo. A curva analítica de adição padrão foi caracterizada pelo coeficiente de correlação linear igual a 0,9986 e desvio padrão de 0,039. Nessa figura, mostramos a curva de adição padrão da solução estoque do padrão sobre 20 μL de solução estoque da amostra do óleo essencial em solução etanol/água a 60% (A); Em (B) Espectros de absorção da mistura etanol/água a 60%, respectivamente, (1), da amostra (2) e das concentrações do padrão de eugenol: (3) $1,28 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (4) $2,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (5) $3,85 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (6) $5,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

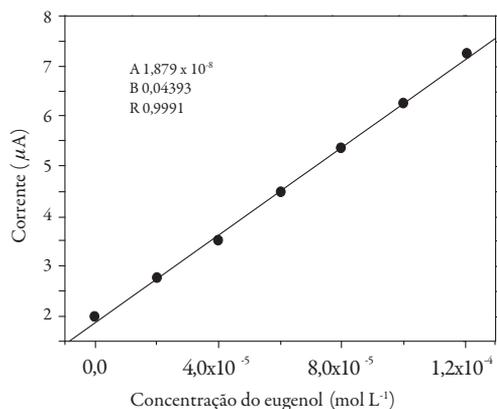


Figura 3. Curva da adição padrão obtida a partir do voltamograma de pulso diferencial da amostra e do padrão de eugenol em solução 55% etanol/tampão BR pH 3,3. Calculamos a concentração de eugenol no óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl a partir da curva de adição padrão para o pico anódico. O valor da corrente lida para o óleo foi de $1,978 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o que resultou numa concentração inicial de eugenol na célula de $4,273 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ que ao ser levado em consideração a pureza do padrão utilizado (98%) e as devidas correlações de diluição, chegamos a um teor de 74,63% de eugenol presente no óleo essencial.

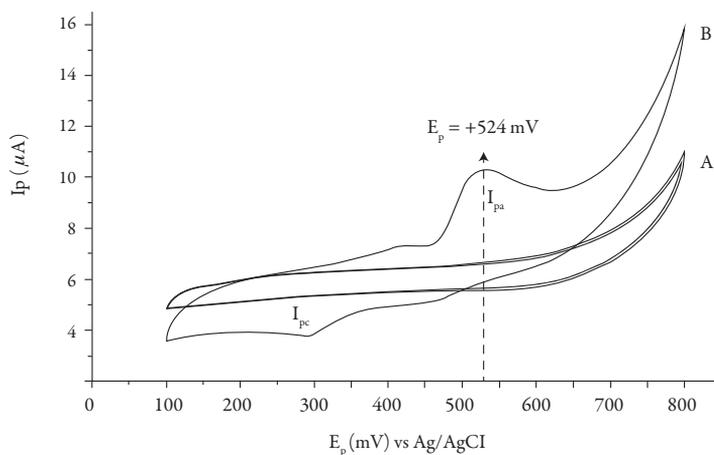


Figura 4. O comportamento eletroquímico do eugenol e o seu intervalo de potencial, nos quais foram obtidos por voltametria cíclica, utilizando eletrodo de carbono vítreo versus eletrodo de Ag/AgCl em solução de etanol/tampão BR pH 3,3 a 55%. Quando o eletrodo era apenas polido e uma varredura de potencial era executada (A), nenhuma resposta eletroquímica era obtida na faixa trabalhada, enquanto que na presença do óleo da *Pimenta dioica* Lindl (B) apareceram dois picos referentes à oxidação (524 mV) e redução (285 mV), indicando que o eugenol sofre processo redox quase reversível.

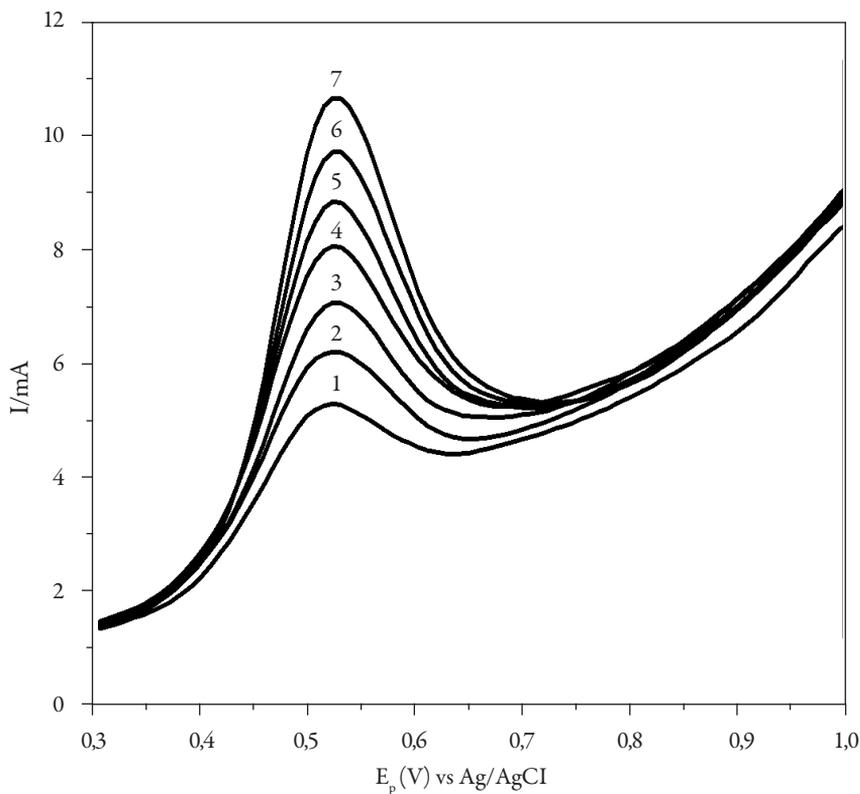


Figura 5. Inicialmente, leu-se a corrente de 100 μL da solução estoque da amostra (1) no eletrólito e no potencial de oxidação de 524 mV. Em seguida, adicionamos volumes pré-determinados de solução padrão de eugenol que resultou nas concentrações: $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (2), $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (3), $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (4), $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (5), $10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (6) e $12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (7), obtidos em solução 55% etanol/tampão BR pH 3.3. O tempo de deposição foi de 100 s, amplitude de pulso de 100 mV e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Atividade antibacteriana

Na tabela 2 apresentamos o resultado da suscetibilidade microbiana do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* (L). Merr e padrão eugenol pelo método da difusão em disco em relação às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera*. Na figura 6, mostramos as imagens dos halos de inibição para óleo essencial. Deste resultado, observamos uma variação nos halos de 11 a 21 mm para o óleo essencial e 13 a 19 mm para o padrão eugenol.

Tabela 2. Sensibilidade das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera* ao óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* (L.) Merr e ao padrão eugenol, utilizando-se o método de difusão em disco.

Bactérias (média das medidas dos halos em milímetro)					
Compostos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia odorifera</i>
Óleo essencial	21	21	20	16	13
Padrão eugenol	19	15	15	16	11

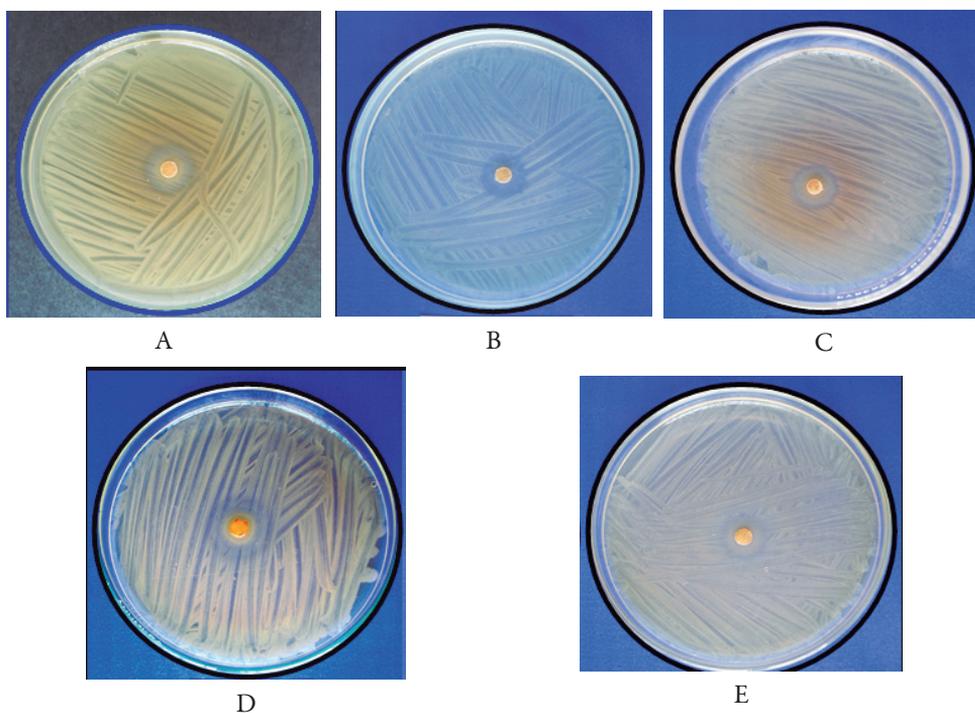


Figura 6. Atividade antibacteriana do óleo essencial da *Pimenta dioica* contra as bactérias (A) *Pseudomonas aeruginosa*, (B) *Staphylococcus aureus*, (C) *Escherichia coli*, (D) *Proteus mirabilis* e (E) *Serratia odorifera*.

Na tabela 3, observamos que os halos de inibição variaram de 8 a 40 mm para algumas bactérias frente aos antibióticos, sendo a penicilina mais efetiva contra a *S. aureus*. Na tabela 4, mostramos os parâmetros utilizados para considerar quando há sensibilidade alta, moderada ou resistência da bactéria ao antibiótico. A partir disso, observamos que

a bactéria *P. mirabilis* resistiu ao antibiótico ampicilina e cefoxitina. Enquanto a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* apresentou sensibilidade alta à gentamicina, moderada ao cloranfenicol e sulfazotrim e resistente à tetraciclina. Por fim, a *Serratia odorifera* resistiu à tetraciclina, pouco sensível ao cloranfenicol e moderadamente sensível à ampicilina e cefoxitina.

Tabela 3. Sensibilidade das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera* frente a alguns antibióticos.

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

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

Embora a ação inibitória do óleo seja semelhante aos antibióticos, observamos que houve diferenças para algumas bactérias. Para *Pseudomonas aeruginosa* (halo igual a 16 mm) estes valores para o tratamento com óleo essencial estão acima dos obtidos pelos antibióticos correspondentes. No caso da *Serratia odorifera*, este valor foi menor para o óleo e maior do que o teste com a tetraciclina, porém próximo ao resultado do teste com a ampicilina e cefoxitina.

DISCUSSÃO

Em decorrência dos problemas provocados pelo uso dos antibacterianos químicos, a busca por produtos de origem natural incitou o interesse no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. Portanto, neste estudo mostramos que o óleo essencial extraído dos frutos da *Pimenta dioica*, que possui em sua maior quantidade o eugenol, e o

Tabela 4. Adaptação dos parâmetros da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para os antibióticos testados.

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

S = sensível; MS = moderadamente sensível; R = resistente (CLSI, 2008 [17]).

padrão eugenol possuem atividade contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera*.

Diversos fatores explicam as diferenças no rendimento e na composição química dos óleos essenciais. Em nosso estudo, o principal componente da *P. dioica* foi o eugenol. Geralmente as quantidades deste composto nos frutos estão em torno de 85% para um rendimento de 2 a 5% de óleo [19, 20]. Para explicar estas diferenças na composição, recorremos ao estudo realizado por Jiang *et al.* [21] que obtiveram diferentes rendimentos ao extrair o óleo essencial dos frutos da *P. dioica* por hidrodestilação e hidrodestilação assistida por micro-ondas. De acordo com os autores, esta diferença ocorre devido às facilidades de infiltração, difusão e troca entre as células do tecido vegetal durante a radiação com micro-ondas. Como este processo é mais lento na hidrodestilação convencional, as perdas de alguns constituintes também são afetadas quando a extração acontece de forma rápida ou lenta [22, 23]. Além do método de extração, outros fatores influenciam na diminuição do rendimento e, conseqüentemente, na alteração da composição dos constituintes do óleo são elas: as diferenças de temperatura, a geologia e a altitude [21].

Apesar do eugenol está em grande quantidade no óleo essencial da *P. dioica*, sabemos que a atividade antibacteriana está mais relacionada com o sinergismo do que com a classe funcional, a potência de grupos funcionais ou ao componente em si. Os

achados do nosso estudo estão concordantes com o estudo realizado por Wang *et al.* [24] quando estes avaliaram que os óleos essenciais *N. chinensis* e *V. officinalis* da China, cujos componentes pertenciam em sua maior parte à classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, apresentaram atividade antimicrobiana em três tipos de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*), e cinco Gram-negativas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas vesicatoria*).

Bactérias Gram-negativas diferenciam-se das Gram-positivas a partir da camada dual que estas possuem e as protege da ação de agentes antimicrobianos. Para penetrar na célula, a parte hidrofóbica do óleo essencial deverá atingir a membrana celular de modo a partir a camada lipídica. Quando isto é provocado, a permeabilidade aumenta e, conseqüentemente, a célula bacteriana é desestabilizada. Embora isso aconteça com a maioria dos compostos, esta ação é menor nos sesquiterpenos devido à baixa solubilidade deste em água [25-27].

No que diz respeito à potência do grupo funcional, sabemos que constituintes fenólicos tais como eugenol e timol são efetivos contra bactérias de origem alimentar [28]. A razão para isto está relacionada com a parte hidrofóbica do composto; as interações da ligação de hidrogênio dos fenóis com a água e, por conseguinte, sua constante de acidez; e a inativação de enzimas e materiais genéticos [29]. Como os componentes do óleo neste estudo pertencem a diferentes funções, a atividade antibacteriana não é exclusiva de um ou outro composto, mas sim da ação conjunta de todos, em um processo chamado de sinergismo [30].

É fato que a atividade antibacteriana de um óleo essencial é comprovada pelo tamanho dos halos de inibição. Em nosso estudo mostramos que o tamanho dos halos de inibição das bactérias tratadas com óleo essencial foi um pouco menor (variação de 11 a 21 mm) em relação aos antibióticos (variação de 8 a 40 mm). Apesar de baixos valores nos halos, é consenso entre os autores considerarem um composto com atividade antibacteriana aquele que possui um valor mínimo no diâmetro dos halos de inibição entre 8 e 10 mm em testes feitos pelo método de difusão em disco [31-33].

Geralmente, os valores baixos obtidos neste método estão relacionados com a velocidade de difusão. Como o óleo essencial é viscoso e possui baixa polaridade, este encontra dificuldade em se difundir no ágar, cuja natureza é hidrófila. Assim, por menor que sejam os valores dos halos, um óleo essencial sempre será considerado um bom agente antibacteriano [34].

Enquanto o agente antibacteriano a base de óleo essencial pode ter qualquer valor no tamanho dos halos, os antibióticos possuem um padrão. Como mostramos na tabela 3, a resistência das bactérias dependerá do tipo de antibiótico.

Em nosso estudo, observamos que algumas bactérias apresentaram resistência, concordando assim com os dados da literatura. O estudo realizado por Fernández-Delgado *et al.* [35] mostrou que a bactéria *Proteus mirabilis* isolada de ostras da costa Venezuelana resistiu à maioria dos antibióticos testados, entre eles a ampicilina, cefoxitina e tetraciclina. Já o estudo realizado por Stock *et al.* [36] mostrou a baixa sensibilidade da *Serratia odorifera* à tetraciclina, estreptomomicina e espectinomomicina. Enquanto os estudos de Gonçalves *et al.* [37] mostraram que a *Escherichia coli* foi sensível à vancomicina e resistente à tetraciclina, e o *Staphylococcus aureus* à vancomicina, cefoxitina e cloranfenicol.

Esta resistência acontece devido às sucessivas mutações que alteram a permeabilidade celular, à degradação celular dos antimicrobianos e às alterações de alvos celulares [38]. Apesar da resistência de algumas bactérias aos antibióticos, neste estudo mostramos que o uso do óleo essencial apresentou resultados de inibição semelhantes aos antibióticos. Portanto, devido a estas pequenas diferenças, concluímos que o óleo essencial da *P. dioica* tem potencial atividade antibacteriana e que pode ser utilizado tanto na indústria de alimentos quanto na farmacêutica.

CONCLUSÕES

Destilamos o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* por hidrodestilação e concluímos que este é constituído em sua maior parte por monoterpenos e pelo composto eugenol, no qual apresentou atividade antibacterianas contra a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera*.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não tem conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. P. Sockett, Social and economic aspects of food-borne disease, *Food Policy*, **18**, 110-119 (1993).
2. D.W. Acheson, Foodborne infections, *Current Opinion in Gastroenterology*, **15**, 538-545 (1999).
3. Q. Shu, Y. Niu, W. Zhao, Q. Chen, Antibacterial activity and mannosylerythritol lipids against vegetative cells and spores of *Bacillus cereus*, *Food Control*, **106**, 106711 (2019).

4. K. Akinyemi, O. Oluwa, E. Omomigbehin, Antimicrobial activity of crude extracts of three medicinal plants used in south-west Nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* **3**, 13-22 (2006).
5. D. Bialonska, P. Ramnani, S.G. Kasimsetty, K.R. Muntha, G.R. Gibson, D. Ferreira, The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota, *International Journal of Food Microbiology*, **140**, 175-182 (2010).
6. F. He, K. Li, X. Zhang, Y. Yang, Y. Fang, F. Xiang, Components, and antibacterial activity of a novel essential oil from the nutrient broth of *Eremothecium ashbyii* H4565, *LWT – Food Science and Technology*, **101**, 389-394 (2019).
7. S. Bedini, G. Flamini, R. Ascrizzi, F. Venturi, G. Ferroni, A. Bader, J. Girardi, B. Conti, Essential oils sensory quality and their bioactivity against the mosquito *Aedes albopictus*, *Scientific Reports*, **8**, 1-10 (2018).
8. P.S. Rao, S. Navinchandra, K. Jayaveera, An important spice, *Pimenta dioica* (Linn.) Merrill: A review, *International Current Pharmaceutical Journal*, **1**, 221-225 (2012).
9. N.F. Morsy, K.S. Hammad, Volatile constituents, radical scavenging, and cytotoxic activities of Mexican allspice (*Pimenta dioica* L. Merrill) berries essential oil, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **21**, 859-868 (2018).
10. G.O. Everton, A.M. Teles, A.N. Mouchrek, E. Victor Filho, Aplicação do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl. como moluscicida frente ao caramujo transmissor da esquistossomose, *Revista Processos Químicos*, **12**, 85-93 (2018).
11. M. Martinez-Velazquez, G.A. Castillo-Herrera, R. Rosario-Cruz, J.M. Flores-Fernandez, J. Lopez-Ramirez, R. Hernandez-Gutierrez, E. del C. Lugo-Cervantes, Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), *Parasitology Research*, **108**, 481-487 (2011).
12. A.C. Lorenzo-Leal, E. Palou, A. López-Malo, Evaluation of the efficiency of allspice, thyme and rosemary essential oils on two foodborne pathogens in *in-vitro* and on alfalfa seeds, and their effect on sensory characteristics of the sprouts, *International Journal of Food Microbiology*, **295**, 19-24 (2019).

13. C.S. Marques, S.G. Carvalho, L.D. Bertoli, J.C.O. Villanova, P.F. Pinheiro, D.C.M. dos Santos, M.I. Yoshida, J.C.C. de Freitas, D.F. Cipriano, P.C. Bernardes, β -Cyclodextrin inclusion complexes with essential oils: Obtention, characterization, antimicrobial activity and potential application for food preservative sachets, *Food Research International*, **119**, 499-509 (2019).
14. D.G. da Rocha-Voris, L. dos Santos-Dias, J.A. Lima, K. dos Santos Cople-Lima, J.B. Pereira-Lima, A.L. dos Santos-Lima, Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors, *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 22541-22551 (2018).
15. T. Misharina, E. Alinkina, I. Medvedeva, Antiradical properties of essential oils and extracts from clove bud and pimento, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **51**, 119-124 (2015).
16. M. Zabka, R. Pavela, L. Slezakova, Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi, *Industrial Crops and Products*, **30**, 250-253 (2009).
17. J.L. Watts, T. Shryock, M. Apley, *et al.*, *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard—third edition*, M31-A3 Vol. 28, No. 8, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
18. J.B. Patel, F.R. Cockerill, P.A. Bradford, *et al.*, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement, M100-S25*, Vol. **35**, No. 3 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2005.
19. M. González de Cosío, *Especies vegetales de importancia económica en México: contribución a su conocimiento*, Porrúa, México, 1984.
20. D.A. Minott, H.A. Brown, Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dioica* (L.) Merr. trees based on composition of leaf volatiles, *Journal of Essential Oil Research*, **19**, 354-357 (2007).
21. Z.-T. Jiang, X. Feng, R. Li, Y. Wang, Composition comparison of essential oils extracted by classical hydro distillation and microwave-assisted hydrodistillation from *Pimenta dioica*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **16**, 45-50 (2013).

22. J. da S. Chaar, *Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie Aniba duckei Kostermans*, tese de doutorado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
23. V.E. Mouchrek Filho, *Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl.*, tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.
24. J. Wang, J. Zhao, H. Liu, L. Zhou, Z. Liu, J. Wang, J. Han, Z. Yu, F. Yang, Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two Valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*, *Molecules* **15**, 6411-6422 (2010).
25. M.M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 564-582 (1999).
26. S.G. Griffin, S.G. Wyllie, J.L. Markham, D.N. Leach, The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour and Fragrance Journal*, **14**, 322-332 (1999).
27. B.F. Brehm-Stecher, E.A. Johnson, Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**, 3357-3360 (2003).
28. R.A. Holley, D. Patel, Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, *Food Microbiology*, **22**, 273-292 (2005).
29. C.N. Wendakoon, M. Sakaguchi, Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract, *Journal of Food Protection*, **56**, 410-413 (1993).
30. S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review, *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223-253 (2004).
31. K. Cimanga, K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. de Bruyne, N. Hermans, J. Totté, L. Pieters, A.J. Vlietinck, Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 213-220 (2002).

32. P.V. Farago, J.P. de Paula, J.I.M. Bittencourt, V. Zarpellon, L.E.M. Checchia, Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae), *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, **10**, 59-63 (2004).
33. M.R. Moreira, A.G. Ponce, C.E. del Valle, S.I. Roura, Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, **38**, 565-570 (2005).
34. S. Glisic, S. Milojevic, S. Dimitrijevic, A. Orlovic, D. Skala, Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **72**, 311-320 (2007).
35. M. Fernández-Delgado, M. Contreras, M.A. García-Amado, P. Gueneau, P. Suárez, Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **49**, 355-359 (2007).
36. I. Stock, Natural antimicrobial susceptibilities of strains of “unusual” *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**, 865-885 (2003).
37. F.A. Gonçalves, M. Andrade Neto, J.N.S. Bezerra, A. Macrae, O.V. de Sousa, A.A. Fonteles-Filho, R.H.S.F. Vieira, Antibacterial activity of GUAVA, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller), *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **50**, 11-15 (2008).
38. H. Nikaido, Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux, *Science*, **264**, 382-388 (1994).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

P.R. Barros-Gomes, J.D. Ribeiro, M.C. Guimarães da Costa, M.W. da Silva Castro, N.B. Neto, A. Vasconcelos-Melo, G. Oliveira-Everton, H. Costa-Louzeiro, M. Alves-Fontenele, H. Souza de Lima, E. Fonseca-Silva, M. do L. de Paula, V.E. Mouchrek Filho, A.N. Mouchrek, Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(3), 656-674 (2020).