

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

**ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DA MISTURA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
FRUTOS DE *Pimenta dioica* Lindl E DOS GALHOS DE *Aniba duckei*
Kostermans**

ALVARO ITAUNA SCHALCHER PEREIRA

**São Luís
2009**

ALVARO ITAUNA SCHALCHER PEREIRA

**ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA
MISTURA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FRUTOS DE *Pimenta dioica* Lindl E DOS
GALHOS DE *Aniba duckei* Kostermans**

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

São Luís

2009

Pereira, Alvaro Itauna Schalcher

Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana da mistura dos óleos essenciais de frutos de *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans / Alvaro Itauna Schalcher Pereira. – São Luís, 2009.

99 fls.

Orientador: Victor Elias Mouchrek Filho.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, 2009.

1. Mistura de óleos – 2. *Pimenta dioica* Lindl 3. *Aniba duckei* Kostermans 4. Atividade bactericida I. Título

CDU 543:383

TÍTULO: “ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA MISTURA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FRUTOS DE *Pimenta dioica* Lindl E DOS GALHOS DE *Aniba duckei* Kostermans”

Alvaro Itauna Schalcher Pereira
APROVADO EM 08 de julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Orientador)

Doutor em Química Analítica - UFMA

Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro

Doutor em Química Orgânica – UFMA

Prof. Dr. Salvador Claro Neto

Doutor em Química Analítica – USP/S.Carlos

Dedico este trabalho

*Em especial à minha mãe, **Maria Cecília Schalcher Pereira**, (in memoriam) a homenagem da mais profunda gratidão por ter sido a mulher mais forte que já conheci, pelo amor, carinho e dedicação ensinamento de vida. Obrigado mãe por ter feito parte de minha vida e ter me dado o dom da vida e por ter contribuído em realizar mais um sonho. Sem você mãe esse sonho não se tornaria em realidade, pois foi um sonho que sonhamos juntos e se fosse sozinho não se tornaria realidade.*

*Ao meu pai, **Manoel da Guia Pereira**, por ser um homem forte e dedicado à família e sempre presente, e pelo exemplo de vida honrada.*

*Aos meus irmãos queridos **Aldemir, Alvimar, Amélia Cecília e Amélia da Guia**, que me deram força e apoio nas horas mais difíceis para superar as adversidades ao longo dessa caminhada.*

*À minha querida filha, **Nayka Lidia**, pelo amor e pela verdadeira razão deste trabalho.*

*Agradeço profundamente a todas as pessoas que entraram em minha vida e me ajudaram para a concretização desse sonho. Também expresso minhas gratidões aos meus preciosos amigos, **Valdez, Gilvan, Jorge, Inaldo, Raphael e Verônica** pela convivência e amizade que durante anos proporcionaram momentos de alegrias e prazer a toda a trajetória e pelo enorme apoio e contribuições à minha jornada.*

*Aos meus sobrinhos, **Adilson, Anderson, Eduardo, Karoline e André**, fontes constantes de alegrias.*

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao todo poderoso Deus, que nos dar o dom da vida e concebe maravilhas inexplicáveis.

Aos meus pais, que um dia sonharam comigo e me deram a vida, agradeço de coração por ter me ensinado que vale a pena acreditar e lutar pelos nossos sonhos.

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, co-orientação e colaboração prestada na realização deste trabalho.

Agradeço a minha querida e inesquecível Alessandra pelo amor, pela paciência, pela compreensão, pelo carisma e disponibilidade em poder me ajudar e ter acompanhado todos os meus trabalhos e entre outros de estar sempre ao meu lado dando apoio quando mais precisei durante toda essa jornada para conclusão do mestrado.

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

Ao professor Antonio Carlos da Silva Ramos que compartilhou com sabedoria os ensinamentos necessários na realização deste sonho.

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

Às colegas da Central Analítica da UFMA, Jemila, 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.

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

“Ninguém pode voltar no tempo e fazer um novo começo, mas qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Mahatma Ganghi

“Bem aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; porque melhor é a sua mercadoria do que a mercadoria de prata, e a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que podes desejar não se pode comparar”.

Provérbios 3: 13 a 1

RESUMO

As plantas são uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de novos fármacos. Com o aumento indiscriminado do uso de antibióticos, bactérias resistentes à terapia antimicrobiana convencional têm surgido e os óleos essenciais são apontados como alternativa para o problema. Neste trabalho promoveu-se a extração dos óleos essenciais das espécies *Pimenta dioica* Lindl (frutos) e da *Aniba duckei* Kostermans (galhos), pelo método de hidrodestilação, utilizando um sistema Clevenger e sua mistura em partes iguais. A espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans, última classificação do pau rosa amazônica, é uma espécie nativa da região amazônica, da família das Lauráceas. E pode atingir até 30m de altura. O tipo de vegetação onde ocorre é de floresta tropical úmida e terra firme. Seu óleo essencial é utilizado em perfumaria, devido ao seu alto teor de linalol. A espécie vegetal *Pimenta dioica* Lindl, conhecida popularmente como pimenta da jamaica, é uma árvore de 6 a 15 m de altura, e pertence à família das Mirtaceae e tem como origem a América Central e oeste da Índia. No Brasil, a planta é encontrada em grande escala no Estado da Bahia e Recife. Seu fruto contém um óleo essencial de grande valor econômico no mercado internacional, devido ao elevado teor de eugenol o qual é largamente usado nas indústrias químicas e farmacêuticas. Após a extração, a mistura dos óleos foram caracterizados pelos seguintes parâmetros físicos: densidade (25 °C), solubilidade em etanol a 70%, índice de refração (N_D^{25}), cor, aparência e odor. Além disso, foi possível, pelas técnicas de espectrofotometria de UV-Vis, cromatografia gasosa e espectrometria de massas, identificar, com segurança o linalol e o eugenol como constituintes majoritários da mistura de óleos essenciais. Na aplicação da mistura de óleos essenciais e dos padrões de eugenol e linalol como agentes antimicrobianos, utilizou-se o Método de Bauer-Kirby para as bactérias *Bacillus cereus*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Thyphi*, *Serratia marcescens* e os antibióticos Ampicilina, Cefotaxima, Cefoxitina, Eritromicina, Gentamicina, Novobiocina, Penicilina, Tetraciclina e Vancomicina, para comparação. Pode-se perceber que o estudo da atividade antimicrobiana revelou que a mistura de óleos essenciais apresentou excelente atividade contra todas as bactérias testadas, sendo que o eugenol e o linalol são os principais responsáveis por esta eficácia. Nessa pesquisa observou-se que a mistura de óleos essenciais é mais eficiente que os padrões de Eugenol e Linalol e os antibióticos testados para os microrganismo *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Chromobacterium violaceum*. Para o *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* e *Salmonella Thyphi* a mistura só não foi mais eficiente que os antibióticos Tetraciclina, Eritromicina, Cefoxitina, Cefotaxima, Ampicilina e Penicilina.

Palavras-chave: Mistura de óleos. *Pimenta dioica* Lindl. *Aniba duckei* Kostermans. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Plants are an important source of biologically active products, many of which are on models for the synthesis of new drugs. With the increase of the indiscriminate use of antibiotics, bacteria resistant to conventional antimicrobial therapy have emerged and the essential oils are mentioned as an alternative to the problem. This work is promoted the extraction of essential oils of *Pimenta dioica* Lindl species (fruit) and *duckeii* Aniba Kostermans (branches), the method of hydrodistillation using a Clevenger and their mixture in equal parts. The species *Aniba ducckei* Kostermans, last classification of pau rosa Amazon, is a native species in the Amazon region, the family of Lauráceas. You can reach 30m in height. The type of vegetation occurring is tropical moist forest and land. Its essential oil is used in perfumery because of its high content of linalool. The plant species *Pimenta dioica* Lindl, popularly known as allspice, is a tree 6 to 15 m in height and belongs to the family of Mirtaceae and is home to Central America and western India. In Brazil, the plant is found in large scale in the State of Bahia and Recife. Its fruit contains an essential oil of great economic value in the international market due to high content of eugenol which is widely used in the chemical and pharmaceutical industries. After extraction, the mixture of oils were characterized by the following physical parameters: density (25 ° C), solubility in 70% ethanol, a refractive index (ND 25), color, appearance and odor. Furthermore, it was possible, the techniques of UV-Vis spectrophotometry, gas chromatography and mass spectrometry to identify with certainty the linalool and eugenol as major constituents of the mixture of essential oils. In applying the mixture of essential oils and standards of eugenol and linalool as antimicrobial agents using the Kirby-Bauer method for the bacteria *Bacillus cereus*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Thyphi*, *Serratia marcescens* and antibiotics ampicillin, cefotaxime, cefoxitin, erythromycin, gentamicin, novobiocin, penicillin, tetracycline and vancomycin, for comparison. You can see that the study of antimicrobial activity showed that the mixture of essential oils showed excellent activity against all bacteria tested, with the eugenol and linalool are the main responsible for this effectiveness. In this research we observed that the blend of essential oils is more efficient than the standards of eugenol and linalool and the antibiotics tested for the pathogen *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Chromobacterium violaceum*. For *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* and *Salmonella Thyphi* the mixture was not more effective than the antibiotics Tetracycline, Erythromycin, Cefoxitin, cefotaxime, ampicillin and penicillin.

Keywords: mixture of oils. *Pimenta dioica* Lindl. *Aniba ducckei* Kostermans. Antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	11
Figura 2 - Folhas e frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	11
Figura 3 - Localização da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	13
Figura 4 - Frutos da <i>Pimenta dioica</i> Lindl	13
Figura 5- Fórmula estrutural plana do eugenol	14
Figura 6- Árvore do <i>Aniba duckei</i> Kostermans	16
Figura 7- Tronco do <i>Aniba duckei</i> Kostermans	16
Figura 8- Fórmula estrutural plana do linalol	17
Figura 9.- Gram-positivas	26
Figura 10- Gram-negativas	27
Figura 11- Sistema Clevenger modificado	33
Figura 12- Espectros de absorção no UV-Vis. (A) padrão de eugenol; (B) mistura etanol/água à 60%; (C) mistura de óleos essenciais; (D) padrão de linalol.	40
Figura 13- Cromatograma da mistura de óleos essenciais	41
Figura 14- Espectros de massas do β -mirceno	43
Figura 15- Espectro de massas do Limoneno	44
Figura 16- Fragmentação tipo reação <i>retro</i> -Diels-Alder do Limoneno	44
Figura 17- Espectros de massas 5-Eteniltetrahidro-5-Trimetil-2-Furanmetanol	45
Figura 18- Espectros de massas do Linalol	45
Figura 19- Espectros de massas do Terpincol	46
Figura 20- Espectros de massas do Aliffenol	46
Figura 21- Espectros de massas do Eugenol	47
Figura 22- Antibiograma <i>B cereus</i> (ERI;TET)	49
Figura 23- Antibiograma <i>B cereus</i> (AMP;PEN)	49
Figura 24- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> causado pela mistura de óleos essenciais	50
Figura 25- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> causado pelo padrão do eugenol	50
Figura 26- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> causado pelo padrão do linalol	51

Figura 27 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> , em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby	51
Figura 28- Antibiograma <i>C. violaceum</i> (GEN;VAN;)	52
Figura 29- Antibiograma <i>C. violaceum</i> (ERI;TET;)	52
Figura 30- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>C. violaceum</i> causado pela mistura de óleos essenciais	53
Figura 31- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>C. violaceum</i> causado pelo padrão do eugenol	53
Figura 32- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>C. violaceum</i> causado pelo padrão do linanol	54
Figura 33 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria <i>C. violaceum</i> , em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby.....	54
Figura 34- Antibiograma <i>E. faecalis</i> (VAN;GEN).....	55
Figura 35- Antibiograma <i>E. faecalis</i> (PEN;AMP).....	56
Figura 36- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>E. faecalis</i> causado pela mistura de óleos essenciais	56
Figura 37- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>E. faecalis</i> causado pelo padrão do eugenol	57
Figura 38- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>E. faecalis</i> causado pelo padrão do linanol	57
Figura 39 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria <i>E. faecalis</i> , em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby	58
Figura 40- Antibiograma <i>L. monocytogenes</i> (TET;PEN).....	59
Figura 41- Antibiograma <i>L. monocytogenes</i> (ERI;VAN)	59
Figura 42- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>L. monocytogenes</i> causado pela mistura de óleos essenciais	60
Figura 43- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>L. monocytogenes</i> causado pelo padrão do eugenol	60
Figura 44- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>L. monocytogenes</i> causado pelo padrão do linanol	61

Figura 45 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria <i>L. monocytogenes</i> , em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby	61
Figura 46- Antibiograma <i>S. thyphi</i> (CFO;CTX).....	62
Figura 47- Antibiograma <i>S. thyphi</i> (AMP;NOV;TET)	62
Figura 48- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>S. thyphi</i> causado pela mistura de óleos essenciais	63
Figura 49- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>S. thyphi</i> causado pelo padrão do eugenol	63
Figura 50- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>S. thyphi</i> causado pelo padrão do linalol	64
Figura 51 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria <i>S. thyphi</i> , em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby	64
Figura 52- Antibiograma <i>S. marcescens</i> (AMP;TET)	65
Figura 53- Antibiograma <i>S. marcescens</i> (CFO;CTX).....	65
Figura 54- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>S. marcescens</i> causado pela mistura de óleos essenciais	66
Figura 55- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>S. marcescens</i> causado pelo padrão do eugenol	66
Figura 56- Halo de inibição de crescimento da bactéria <i>S. marcescens</i> causado pelo padrão do linalol	67
Figura 57 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria <i>S. marcescens</i> , em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros físico-químicos das espécies <i>Pimenta dioica</i> Lindl e <i>Aniba duckei</i> Kostermans comparadas com a mistura de óleos essenciais.....	39
Tabela 2	Composição química da mistura de óleos essenciais.....	42
Tabela 3	Zonas de inibição em relação aos antibióticos testados.....	48
Tabela 4	Diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos microrganismos testados pelos antibióticos escolhidos.....	68
Tabela 5	Halos de inibição de crescimento das bactérias <i>Bacillus cereus</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella thyphi</i> , <i>Serratia marcescens</i> , causados pela mistura de óleos essenciais e seus padrões, o eugenol e linalol.....	69
Tabela 6	Atividade antibacteriana dos antibióticos testados, dos padrões de linalol e eugenol e da mistura de óleos.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX	Cefotaxima
EM	Espectrometria de Massas
ERI	Eritromicina
F.M.	Fórmula Molecular
°GL	Grau Gay Lussac
GEN	Gentamicina
ISO	International Standard for Organization
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LPQA	Laboratório de Pesquisa em Química Analítica
MM	Massa molar
MDD	Método de difusão em discos
MS	Moderadamente Sensível
NOV	Novobiocina
OXA	Oxacilina
PEN	Penicilina

R	Resistente
RMN $^1\text{H}^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13
sp	Espécie
SNC	Sistema Nervoso Central
S	Sensível
SUDAM	Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia
TET	Tetraciclina
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UV-Vis	Ultravioleta-vísivel
VAN	Vancomicina
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

	p.
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
Capítulo 1	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 2	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Plantas medicinais.....	03
2.2 Óleos essenciais.....	07
2.2.1 Processos de extração.....	08
2.2.2 Aplicações dos óleos essenciais.....	08
2.2.3 Avaliação da qualidade dos óleos essenciais.....	09
2.2.4 Análise dos componentes dos óleos essenciais.....	09
2.3 <i>Pimenta dioica</i> Lindl (pimenta da jamaica).....	10
2.4 <i>Aniba duckei</i> Kostermans (pau rosa).....	15
2.5 Técnicas analíticas.....	18
2.6 Métodos de quantificação.....	19
2.7 Teste de susceptibilidade antimicrobiana: Método de Bauer-Kirby.....	19
2.8 Antibióticos.....	20
2.8.1 Ampicilina (AMP).....	21
2.8.2 Cefoxitina (CFO).....	22

2.8.3	Cefotaxina (CTX).....	22
2.8.4	Eritromicina (ERI).....	23
2.8.5	Gentamicina (GEN).....	23
2.8.6	Novobiocina (NOV).....	24
2.8.7	Penicilina (PEN).....	24
2.8.8	Tetraciclina (TET).....	25
2.8.9	Vancomicina (VAN).....	25
2.9	Bactérias testadas.....	26
2.9.1	<i>Bacillus cereus</i>	27
2.9.2	<i>Chromobacterium violaceum</i>	28
2.9.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	28
2.9.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.9.5	<i>Salmonella Thyphi</i>	29
2.9.6	<i>Serratia marcescens</i>	30
 Capítulo 3		
	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
 Capítulo 4		
	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
4.1	Origem, coleta e preparo da amostra de vegetal.....	32
4.2	Extrações dos óleos essenciais.....	33
4.3	Características físico-químicas dos óleos essenciais e da mistura.....	34
4.3.1	Densidade.....	34
4.3.2	Solubilidade em etanol (70%).....	34

4.3.3	Índice de refração.....	34
4.3.4	Cor.....	35
4.3.5	Aparência.....	35
4.4	Análises químicas da mistura de óleos essenciais.....	35
4.4.1	Análise por espectrofotometria no UV-Vis.....	35
4.4.2	Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas.....	35
4.5	Padrões de eugenol e linalol.....	36
4.6	Testes biológicos usando a mistura de óleos essenciais.....	36
4.6.1	Microrganismos testados.....	36
4.6.2	Antibiogramas.....	36
4.6.2.1	Preparo do inóculo.....	37
4.6.2.2	Inoculação das placas.....	37
4.6.2.3	Dispersão dos discos.....	37
4.6.2.4	Antibióticos testados.....	37
4.6.2.5	Leitura dos resultados.....	38
 Capítulo 5		
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		39
5.1	Características físico-químicas da mistura dos óleos essenciais.....	39
5.2	Análise espectrofotométrica da mistura de óleos essenciais na região do ultravioleta – visível.....	40
5.3	Análises por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.....	41
5.4	Antibiogramas.....	47
5.4.1	Antibiograma para o <i>Bacillus cereus</i>	48
5.4.2	Antibiograma para o <i>Chromobacterium violaceum</i>	52
5.4.3	Antibiograma para o <i>Enterococcus faecalis</i>	55

5.4.4	Antibiograma para o <i>Listeria monocytogenes</i>	58
5.4.5	Antibiograma para a <i>Salmonella thyphi</i>	62
5.4.6	Antibiograma para o <i>Serratia marcescens</i>	65
Capítulo 6		
	CONCLUSÃO	71
Capítulo 7		
	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	72
Capítulo 8		
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é prática antiga entre curandeiros, xamãs, benzedores e feiticeiros. A arte destes “milagreiros” hoje pode ser comprovada por laboratórios científicos de todo o mundo. Pesquisas científicas passaram a avaliar experimentalmente a veracidade destas informações, tendo em vista a descoberta de novos medicamentos, com base justamente nos conhecimentos que foram adquiridos durante milhares de anos e repassados de geração em geração por aqueles que são os ancestrais da ciência moderna (DI STASI, 1996).

Um dos assuntos mais fascinantes nessas pesquisas com plantas medicinais é a origem desse conhecimento, as formas e os procedimentos que foram utilizados para descobrir as virtudes terapêuticas de várias espécies vegetais. Seguramente, o método mais utilizado foi o 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 (MONTEIRO, 2004).

A esse respeito dizem que durante as últimas décadas tem havido uma ressurgência pelo interesse em plantas como fonte medicinal e os motivos para isso são muitos. Dessa forma explicam que numerosas investigações 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. De fato falam que os agentes antimicrobianos oriundos de plantas são abundantes e a investigação de novas metodologias vem admitir o poder de algumas preparações com plantas no tratamento e na cura de infecções, confirmando desse modo o conhecimento popular (DIAZ, *et al.*, 2001).

Estima-se que cerca de 70% de várias cepas de bactérias patogênicas são resistentes há pelo menos um dos antimicrobianos comumente usados para combatê-las e essa resistência está associada ao uso desordenado de antibióticos quer em hospitais, clínicas veterinárias ou por pacientes que adquirem o medicamento sem uma orientação médica (DUFFY *et al*, 1999; CDC, 2001; HOEFLER *et al*, 2003).

Nos últimos 30 anos, os estudos com extratos de plantas consideradas medicinais (pelo conhecimento popular), têm sido aconselhados pela Organização Mundial de Saúde - OMS (2002). A partir de 1978 a instituição passou a aconselhar a comunidade científica a intensificar e divulgar os estudos com plantas. Tal fato levou a organização a compilar um inventário com mais de 20.000 espécies de plantas medicinais (SOARES, *et al.*, 2002).

De fato, por séculos, as plantas têm sido utilizadas como medicamentos para tratamento de doenças. Com o passar dos anos, novas práticas curativas surgiram e com elas a tecnologia a serviço da medicina vem sendo incrementada. Certamente, o homem do século XX avançou os seus conhecimentos acerca de diversos fatores etiológicos relacionados a doenças veiculadas por alimentos e água (ALZOREKY & NAKAHARA, 2003).

É de suma importância a pesquisa analítica nesta área, uma vez que, 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 (BEZERRA, 2004).

Dentre os vários óleos pesquisados encontram-se em evidência os óleos da *Pimenta dioica* Lindl (pimenta da jamaíca) e da *Aniba duckei* Kostermans (pau rosa). Pesquisas anteriores testaram os óleos de forma isolada, assim sendo, com o intuito de inovar, este trabalho foi desenvolvido através do Estudo Analítico e Avaliação da Atividade Antibacteriana da Mistura dos Óleos Essenciais de Frutos de *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans, comparando-os com antibióticos comerciais, padrões de eugenol e linalol.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

A humanidade desde tempos longínquos utilizava 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 às 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, 2002).

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

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, 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 ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo gênio humano (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 1999).

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

Ebergs, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joaquim. Foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (MOUCHREK FILHO, 2001).

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, 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 (DEMO, M; OLIVIVA, M; RAMOS, B; ZIGADLO, J., 2001).

É amplo o universo de disciplinas envolvidas na pesquisa de produtos naturais, extremamente complexo e intricado, 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

A *International Standart Organisation* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos polícarpos de frutos cítricos (Rutacaceae). 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 serem 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 (DI STASI, 1996; LEMOS, 1990).

O termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais freqüente a destilação por arraste de vapor d’água (MOUCHREK FILHO, 2001).

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

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 (MOUCHREK FILHO, 2000; MONTEIRO, 2004).

É interessante notar que os óleos essenciais diferem-se quimicamente dos óleos vegetais e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Já os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Enquanto que os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturados a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado (WILLIAMS, 1996).

Percebe-se também que os óleos vegetais poliinsaturados utilizados nos alimentos são bons para organismo, mas quando submetidos a processos oxidativos, como a foto-oxidação e a termo-oxidação, suas ligações duplas são alvos fáceis na decomposição desses óleos, transformando-os em uma série de produtos secundários prejudiciais ao organismo. (SEME YOUSSEF REDA E PAULO BORBA CARNEIRO, 2007)

As designações “essenciais” derivaram-se da suposição de que representassem a própria essência do sabor e do odor. Podem ser líquidos (às vezes semi-sólidos e raramente sólidos) e insolúveis em água. Evaporam-se a velocidades diferentes quando em condições normais de temperatura e pressão.

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, 2007).

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, alcoóis 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 (WILLIAMS, 1996).

A respeito das suas propriedades e aplicações elas são muitas e diversificadas. São utilizados, por exemplo, como estomáquicos (WEYERSTAHL, *et al.*, 1999), flavorizantes (ELGAYYAR, *et al.*, 2001; WEYERSTAHL, *et al.*, 1999), agentes antimicrobianos (NASCIMENTO, 2004), analgésicos (ITO, *et al.*, 2005) etc. Além disso possui larga aplicação industrial e a literatura acerca desse assunto é ampla e diversificada: eles são utilizados na agricultura como atrativo de insetos (MONTEIRO, 2008); na indústria de

perfumes e cosméticos, como fixadores (BEZERRA, 2004); na indústria alimentícia, na conservação de alimentos (HOLEY, PATEL, 2005) dentre outras.

2.2.1. Processos de extração

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

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

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 empregada para extrair óleo essencial de pétalas de flores onde as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante 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 possuem alto valor comercial. 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 (MOUCHREK FILHO, 2001).

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; SPITZER, 2003).

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; SPITZER, 2003).

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 (WILIANS, 1996; MOUCHREK FILHO, 2001).

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, farmacêuticas e mais recentemente na conservação de alimentos (SIMÕES & SPITZER, 2003).

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 conseqüências 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 (SIMÕES & SPITZER, 2003).

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 ser citados: os organolépticos, controle de pureza, análise qualitativa de seus componentes, análise do teor de óleo volátil em drogas vegetais, métodos cromatográficos e outros (SIMÕES; SPITZER, 2003).

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 freqüentes são a Espectroscopia de Ultravioleta-vísivel (UV-Vis), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de

Hidrogênio e de Carbono 13 (RMN ^1H e ^{13}C) e a Espectrometria de Massas (EM). (SILVERSTEIN, 2007).

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

Originária da América Central, México e oeste da Índia, essa espécie, também conhecida como pimenta da jamaica, pertence à família Mirtaceae que compreende cerca de 140 gêneros e 3.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e Austrália temperada (SOUSA, 2003). No Brasil é encontrada na região sudeste, e sul da Bahia e Recife. (OLIVEIRA, 2008).

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), (MENEZES, 2007).

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

O nome “pimenta” foi atribuído ao fruto seco da árvore da “*all spice*” (Figura 1) e foi originário da palavra “pimienta” (termo espanhol para pimenta) por exploradores espanhóis, logo depois que Colombo descobriu o Novo Mundo. Este termo foi completamente impróprio, pois foi baseado somente na aparência visual com o grão de pimenta preta, no que diz respeito ao tamanho, forma e aroma (GUENTHER, 1950; PARRY, 1969; KATZER, 2004; ASTA, 2004).

A espécie é uma árvore fortemente aromática em todas as suas partes, apresentam folhas pecioladas, elípticas alongadas; flores numerosas, pequenas, dispostas em cimeiras axilares (Figura 2). Contém fruto baga, globoso, piriforme, contendo duas sementes, raras vezes uma semente (CORREA, 1978).



Fonte: WIKIMEDIA, 2008.

Figura 1-Árvore da *Pimenta dioica* Lindl



Fonte: WIKIMEDIA, 2008.

Figura 2-Folhas e frutos da *Pimenta dioica* Lindl

Na História Antiga, a *Pimenta dioica* Lindl foi usada principalmente para embalsamentos. Com a descoberta do Novo Mundo, ela foi um condimento exótico que atingiu altos preços e promessa de fama e fortuna aos exploradores espanhóis (THE EPICENTRE, 2004).

No século XVII foi usada como conservante de carnes em longas viagens marinhas. Hoje é usada em pickles, especialmente na Noruega, Finlândia e Suécia (THE EPICENTRE, 2004). Na Jamaica é usada na cozinha como temperos de sopas, guisados, pickles, chás, bolos, biscoitos, pastéis e produtos alimentares usados em ketchups, salsichas e sanduíches. Também é utilizada na produção de bebidas “pimento dram” obtida dos frutos. Nas Bahamas produz-se um chá muito agradável obtido das folhas. A árvore nova é utilizada na fabricação de bengalas e cabos de guarda-chuva (DUKE, 2002).

A mesma espécie vegetal tem larga aplicação medicinal em vários países (Figura 3), dentre os quais podemos citar a Jamaica onde os frutos na forma de decoto são utilizados no tratamento de resfriados, hemorragias e estomatites; na Costa Rica, as folhas são usadas com funções carminativas e estomáquicas, excelente para diabetes. Na Guatemala aplica-se externamente em escoriações e dores reumáticas; em Cuba é uma bebida refrescante, chá depurativo e estimulante tônico, o óleo essencial do fruto é usado medicinalmente em diarreia (dispepsia) e flatulência (DUKE, 2002).

Rodríguez *et al* (1996) avaliaram a atividade biológica de um creme do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl 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* Lindl pode ser empregado profilaticamente para evitar enfermidades transmitidas por mosquito, como a dengue hemorrágica, por exemplo.

No Brasil, a *Pimenta dioica* Lindl, apresenta alguns sinônimos como: pimenta da jamaica, pimenta de coroa e murta pimenta. A espécie apresenta a seguinte posição taxonômica: Reino: Vegetal; Divisão: Angiosperma; Classe: Dicotiledôneas; Ordem: Mirtales; Família: Mirtaceae; Gênero: Eugenia; Espécie: *Pimenta dioica* Lindl (PARRY, 1969; PURSEGOLVE, 1960; CORREA, 1978; BARROSO, 1978).

Os frutos são pequenos (diâmetro \cong 8 mm), de coloração escura, quase que preta quando secos, são empregados como especiarias (Figura 4). Para a destilação e obtenção de óleo essencial utilizam-se as folhas, já que este óleo é rica em eugenol substância de grande valor comercial. Como quase todos os condimentos possuem ação digestiva e carminativas. Também é anti-séptico e por isso era empregado para conservar cadáveres e é tido como afrodisíaco (MENEZES, 2007).



Fonte: WIKIMEDIA, 2008.
Figura 3 - Localização da *Pimenta dioica* Lindl (Verde)



Fonte: WIKIMEDIA, 2008.
Figura 4 - Frutos da *Pimenta dioica* Lindl

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

O eugenol é o componente majoritário do óleo da *Pimenta dioica* Lindl presente tanto nas folhas como nos frutos, é o responsável principal por suas atividades antimicrobianas ou antioxidantes. O eugenol é um composto aromático que está presente no cravo, canela, sassafrás e mirra, sua nomenclatura oficial na IUPAC é 4-*alil*-2-metoxifenol. e apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molecular $164g.mol^{-1}$, conforme a Figura 5 (EXTRAÇÃO DE EUGENOL, 2007).

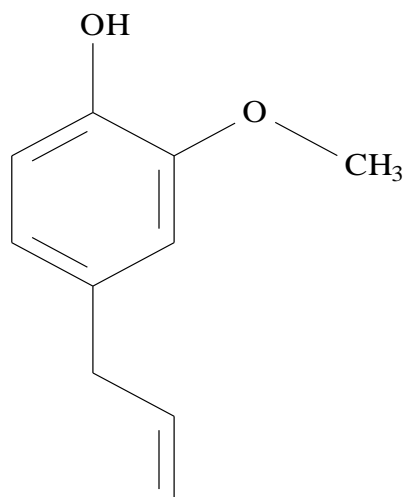


Figura 5 - Fórmula estrutural plana do eugenol

O eugenol tem sido bastante pesquisado, e várias são suas aplicações. Por exemplo, em uma pesquisa de Vásquez (2001) e outros autores, compararam-se os efeitos antifúngicos do eugenol e do timol em meios de cultura e em diferentes queijos hispânicos. Neste estudo encontrou-se um 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.

Este constituinte, o eugenol, é um líquido fracamente amarelado, que escurece ao ar, com aroma de cravo, e com sabor ardente e picante. Sua fórmula molecular é C₁₀H₁₂O₂ e massa molar 164g/mol (MOUCHREK FILHO, 2000). Este é muito usado como flavorizante (CRAVEIRO, 1981), antioxidante (FAJARDO, 1997), antiespasmódica (MOUCHREK FILHO, 2000), anti-séptico, agente antimicrobiano, agente bactericida, fungicida, inibidor inflamatório (OMS, 2002), antialérgico, na composição de cosméticos assim como no tratamento de AIDS (ATRASSO, 2002).

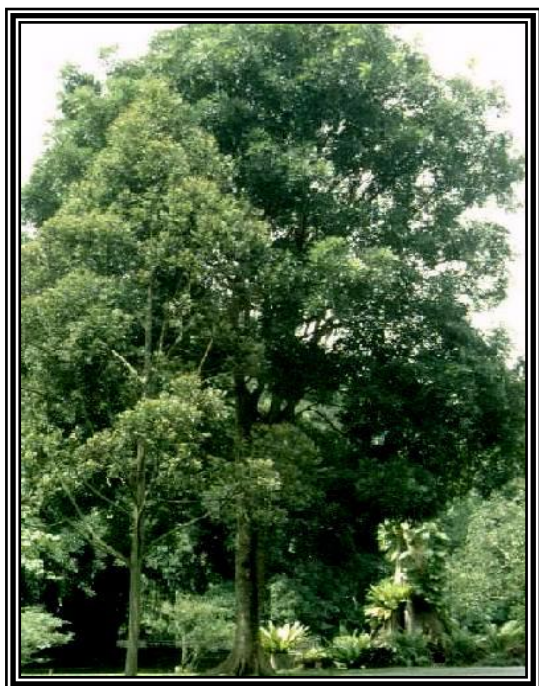
2.4 *Aniba duckei* Kostermans (pau rosa)

A família Lauraceae é considerada uma das mais primitivas pertencentes à divisão Manoliophyta. Tal fato se deve às suas características morfológicas e anatômicas que as aproximam de outras famílias como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (CRONQUIST, 1988). As Lauraceae apresentam-se amplamente distribuída através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formadas por 49 gêneros e espécies variando entre 2500 a 3000, (WERFF, H, 1996).

Os primeiros registros relativos à utilização das espécies desta família datam de 2.800 a.C, sendo originários da Grécia antiga. Isso influenciou o nome de muitos gêneros que fazem uma alusão àquela época. *Laurus* L., por exemplo, vem do celta “lauer” que significa verde ou ainda “laus” que significa louvor e o gênero *Phoebe*, tem o seu nome relacionado ao deus Apolo. Outras espécies utilizadas desde a Grécia antiga são as pertencentes ao gênero *Cinnamomum* Schaeffer, que significa “caneleira” em grego (BARROSO, G. M, COE-TEIXEIRA, B, 1978).

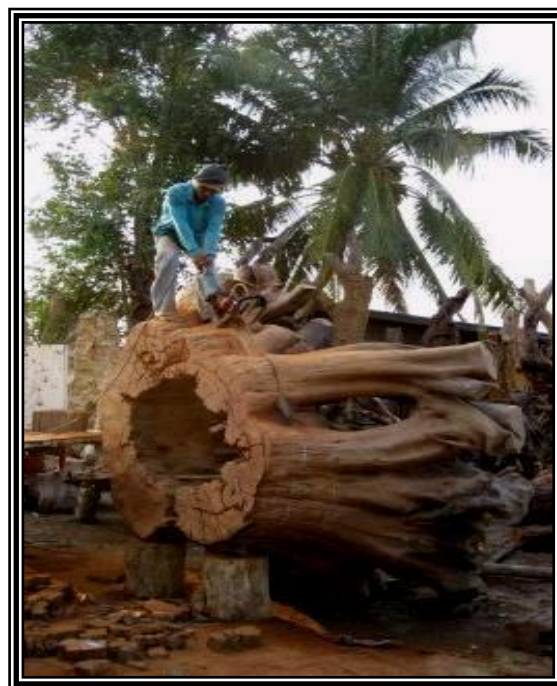
As Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica. Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, C. A, 2001).

Sua árvore (Figuras 6 e 7) pode atingir até 30 m de altura, tem casca pardo-avermelhada (daí o nome pau rosa), folhas semicoriáceas, lisas e inflorescência em panículas multifloras delicadas. As flores são ferrugíneas e o fruto é uma drupa, de 2 a 3 centímetros de comprimento, com cúpula bastante espessa. O tipo de vegetação onde ocorre é de floresta tropical úmida e terra firme. Possui reprodução anual, porém bastante irregular, apresentando crescimento lento e madeira de alta densidade com reconhecido valor comercial (BIOSAPIENS, 2004).



Fonte: WIKIMEDIA, 2008

Figura 6 - Árvore do *Aniba duckei* Kostermans



Fonte: WIKIMEDIA, 2008

Figura 7 - Tronco do *Aniba duckei* Kostermans

Dessa forma, Kalil Filho (2000) destaca que pesquisadores brasileiros estão analisando formas de produção do óleo que não comprometam o ambiente e ao mesmo tempo garantam a qualidade dos produtos, inclusive produzindo o óleo a partir de folhas e galhos finos, não sendo necessário, portanto, o corte das árvores.

A ameaça de extinção dessa espécie conduziu aos controles crescentes regulamentados e vigiados por órgãos governamentais no Brasil, conscientizando, orientando tecnicamente na extração do óleo utilizando galhos e folhas ao invés de sacrificar a árvore, estudos com outras plantas com teor de linalol, reflorescimento desenvolvendo o cultivo como uns dos meios de alcançar produção de óleo sustentável (CRAVEIRO, A.A, 1981).

No Brasil, ocorre ao oeste do Amapá, ao longo de ambos os lados do Rio Amazonas, tendo grandes concentrações em Curuá-Uma (perto de Santarém) para a fronteira peruana, ao sul e do rio Trombetas para a Colômbia, ao norte. Também é encontrado ao redor de Belém e na Ilha de Marajó (SUDAM, 1972).

O *Aniba duckei* Kostermans apresenta diferenças morfológicas e na composição do óleo essencial em relação à espécie nativa da Guiana Francesa, *Aniba roseodora* ducke. É sabido que a característica da árvore do *Aniba duckei* Kostermans é de grande porte, podendo atingir trinta metros de altura e o tronco é a parte usada para a extração do óleo essencial por possuir componente principal fonte natural do óleo tão rico no monoterpene linalol (KALIL FILHO, 2000).

O óleo essencial dessa espécie, segundo Chaar (2000), caracteriza-se por seu forte odor, incoloração, densidade inferior à da água, solubilidade em solventes orgânicos usuais e álcool 70°GL. De grande valor no mercado internacional, é em grande parte o linalol (Figura 8), composto normalmente encontrado sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira dupla ligação e opticamente ativo (CAMPOS, 2003).

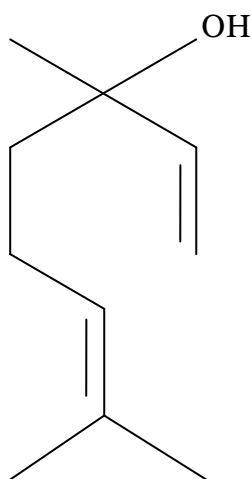


Figura 8 - Fórmula estrutural plana do linalol

No que diz respeito a testes de atividade antibacteriana, Hammer et al. (1999) analisaram 52 óleos essenciais, dentre os quais o pau rosa, frente dez diferentes bactérias, incluindo *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*. Os autores apontaram que o poder de inibição do óleo desta planta frente a todos os microrganismos testados foi eficiente, sobretudo, para esses dois gêneros.

Santos (2004), em seu estudo acerca do pau rosa, descreve que o óleo essencial da espécie apresentou excelente ação antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus e *Salmonella sp.* Entretanto, a referida autora verificou que esse mesmo óleo quando testado frente a *Pseudomonas aeruginosa* não proporcionou atividade, o que pode ser atribuído ao fato dessa bactéria ser mais resistente. Ademais, o acetato de linalila não apresentou nenhuma inibição frente essas bactérias.

Nascimento (2004) demonstrou que o óleo de pau rosa apresentou atividade antibacteriana, principalmente frente às bactérias *Salmonella sp.* e *Staphylococcus coagulase* positiva, mostrando dessa forma que esse óleo pode ser utilizado para esse propósito.

2.5 Técnicas analíticas

Durante o desenvolvimento da química várias técnicas analíticas foram desenvolvidas, desempenhando 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 em nível de ppt (parte por trilhão) 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), (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

2.6 Métodos de quantificação

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 da

normalização. Neste método, faz-se a integração das áreas dos picos cromatográficos utilizando um software do equipamento CG-EM (Varian 2100).

A normalização é muito usada em técnicas analíticas, principalmente em amostras complexas, como é o caso dos óleos essenciais e, também, quando a concentração do analito é muito baixa e existem efeitos de diluição em matrizes (PINO; ROSADO; GONZALEZ, 1989).

2.7 Teste de susceptibilidade antimicrobiana: 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 Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2009), 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 Müeller-Hinton nas quais as bactérias a serem testadas são cultivadas e incubadas por 24 horas 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 Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2009).

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, 2008).

Algumas vantagens do método da difusão de disco são: a flexibilidade dos antibióticos que podem ser testados (DIGHE, 2001), além de ser simples econômico e reprodutível. Porém a maior de todas suas vantagens é o fato de ele fornecer informações sobre suscetibilidade/resistência um, ou mais dias mais cedo em relação ao que seria em outros métodos.

2.8 Antibióticos

É uma droga com capacidade de interagir com microrganismos mono ou pluricelulares que causam infecções no organismo. Se as primeiras substâncias descobertas eram produzidas por fungos e bactérias, atualmente são sintetizadas em laboratórios farmacêuticos e tem a capacidade de impedir ou dificultar a manutenção de certo grupo de células vivas. São utilizados na Medicina para a luta contra infecções bacterianas. Seu uso indiscriminado e sem controle médico faz com que surjam cepas de bactérias resistentes a estas drogas, sendo necessária a descoberta constante de novas drogas mais eficazes. Isto tem aumentado consideravelmente o custo do tratamento das infecções. (ANVISA, 2004).

Os antibióticos são usados para tratar infecções bacterianas que variam desde doenças quase mortais, como a meningite, a problemas comuns como a acne e a amigdalite. Não servem para curar doenças causadas por vírus, tais como constipações ou gripe (TAVARES & MAGALHÃES, 2007).

Segundo Trabulsi e Alterthum (2004), antibióticos são agentes que interferem nas diversas atividades da célula bacteriana, inibindo seu crescimento ou causando a morte do microrganismo. Quando o antibiótico provoca a eliminação do agente bacteriano é denominado bactericida. Por outro lado, se o antibiótico somente inibir o crescimento e a

reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata, recebe a denominação de bacteriostático. (TAVEIRA *et al*, 2004).

Os antibióticos são usados para tratar infecções bacterianas, que variam desde doenças quase mortais, como a meningite, a problemas comuns como a acne e a amigdalite. Não servem para curar doenças causadas por vírus, tais como constipações ou gripe (ANTIBIÓTICOS, 2007).

A comprovada eficácia dos antibióticos diante das bactérias, muitos não causa nenhum efeito a determinados patógenos, isso porque alguns desses microrganismos apresentam resistência natural ao medicamento ou então adquirem resistente após contato com o antibiótico. O uso inadequado e exacerbado de antibióticos também pode levar à resistência bacteriana (MOREIRA, 2005).

Os antibióticos testados para efeito de comparação foram a ampicilina, cefoxitina, cefataximina, eritromicina, gentamicina, novabiocina, penicilina, tetraciclina, vancomicina e, sendo que estes foram escolhidos seguindo recomendações da CLSI para as bactérias estudadas, descritos a seguir:

2.8.1 Ampicilina (AMP)

A Ampicilina é indicada em infecções por bactérias não produtoras de betalactamase; infecções do trato respiratório superior e inferior, meningites, trato gênito-urinário, pele e tecidos moles, trato biliar e trato gastrointestinal. Infecções por meningococos, pneumococos, grupo viridans de estreptococos, listelias, algumas cepas de *H. influenzae*, *Salmonella spp*, *Shiguella spp*, *E. coli*, *Enterobacter spp* e *Klebsiella spp*. A dose e duração da terapia dependerão da idade, sensibilidade do microrganismo e gravidade da infecção, e deverão ser ajustados à resposta clínica do paciente, além disso, é contra-indicado para quem apresenta histórico de hipersensibilidade às penicilinas e cefalosporina (ANVISA, 2007).

As principais indicações da ampicilina relacionam-se às meningites meningocócicas, febre paratífóide, faringite bacteriana, gonorréia, pneumonia por *Haemaphilus influenzae*, pneumonia por *Proteus mirabilis*, septicemia bacteriana, infecções

de pele e tecidos moles, produzidas por *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *shigella*, *Salmonella Thiphy* e outras espécies de *Salmonella*, apesar de na atualidade ser crescente a resistência à ampicilina entre tais microrganismos (MARINHO, 2005).

2.8.2 Cefoxitina (CFO)

É indicado 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 dependerão da idade, sensibilidade do microrganismo e gravidade da infecção, e deverão ser ajustados à resposta clínica do paciente, além disso, é contra-indicado para quem apresenta reações alérgicas às penicilinas e cefalosporina. Mais ativa contra bactérias Gram-negativas (ANVISA, 2007).

Trata-se de uma cefalosporina da 2ª geração com atividade bactericida sobre numerosos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, especialmente bactérias anaeróbias Bacteróides. Sua ação antibacteriana é devida à inibição da síntese da parede celular, é resistente a uma grande variedade de beta-lactamases e cefalosporina. Desenvolve sua ação preferencialmente sobre microrganismos Gram-positivos e, com muito menos frequência, sobre Gram-negativos (MARINHO, 2005).

2.8.3 Cefotaxima (CTX)

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 alongação das bactérias sensíveis. As bactérias que se dividem de forma rápida são as mais sensíveis à ação das cefalosporina (MARINHO, 2005).

É indicado 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).

2.8.4 Eritromicina (ERI)

É um antibiótico macrolídeo, introduzido na medicina em 1958 no tratamento das infecções por germes Gram-positivos. Nos anos 70, seu uso foi associado a maior incidência de toxicidade hepática que outros antibióticos. Esta evidência foi contestada posteriormente. Em Singapura, sua exportação foi banida. Na Grécia, foi retirado do mercado. Na Suécia foi banido para uso e venda, devido a casos de Hepatite colestática e icterícia. Na Dinamarca seu registro foi cancelado. No Peru, na embalagem deve existir a advertência de possível dano ao fígado e em caso de repetições no uso, ocorrência de náuseas, vômitos, icterícia e eosinofilia. Também deve advertir-se que o uso em mulheres grávidas ainda não possui níveis de administração. Existem alegações de que seja o tratamento de escolha para Doença de Legionaire (CLORANFENICOL, 2007).

2.8.5 Gentamicina (GEN)

Constitui uma opção em infecções graves causadas por bacilos gram negativos, sendo utilizada em infecções comunitárias. Em relação às infecções por microrganismos gram positivos, gentamicina é atualmente o aminoglicosídeo de escolha, quando há sinergismo com penicilina G ou ampicilina, no trato contra estreptococos ou enterococos é desejável (MARINHO, 2005).

É indicado no caso de infecções graves (ósseas, respiratórias, meningite, endocardite e septicemia). Infecções geniturinárias, pielonefrite aguda, prostatites, infecções respiratórias, infecções gastrointestinais, infecções da pele e tecidos moles (incluindo

queimadura e feridas infectadas), infecções intra-abdominais e infecções oculares. A dose e duração da terapia dependerão da idade, sensibilidade do microrganismo e gravidade da infecção, e deverão ser ajustados à resposta clínica do paciente, além disso, é contra-indicado para quem apresenta hipersensibilidade aos aminoglicosídeos e pós-operatório imediato (ANVISA, 2007).

2.8.6 Novobiocina (NOV)

A novobiocina é um antibiótico eliminado fundamentalmente junto com a bile, sob a forma de um metabolito resultante de sua conjugação com o ácido glicurônico. Somente 3% a 5% da droga são excretados pela urina. Devido ao seu metabolismo, a novobiocina compete com a bilirrubina na conjugação com o ácido glicurônico, inibindo a ação da glicuronil-transferase no metabolismo da bilirrubina. Em virtude disto, a droga pode causar hiperbilirrubinemia não conjugada, com potencial efeito danoso em crianças recém-nascidas e lactentes. Sendo assim, a novobiocina é contra-indicada neste grupo de crianças, sendo também prudente evitar o seu emprego em pacientes com hepatopatias graves (TAVARES, 2001).

2.8.7 Penicilina (PEN)

As penicilinas são ácidos fracos que alcançam diminuta concentração no leite, insuficiente para tratar infecções na criança amamentada. Pertencem ao Grupo II de drogas usadas na lactação. Podem, entretanto, sensibilizar o lactante e causar reações de hipersensibilidade na criança se esta usar o antibiótico posteriormente. A penicilina G, a ampicilina, a amoxicilina surgem no leite numa proporção de 5 a 10% da existente no plasma materno. Tem sido descrita a ocorrência de diarreia e candidíase oral em crianças amamentadas por nutrízes em uso de ampicilina. A carbenicilina e a oxacilina atingem concentração no leite inferior a 4% da presente no plasma materno, não havendo inconveniente em seu uso na mulher que amamenta (TAVARES & MAGALHÃES, 2007).

2.8.8 Tetraciclina (TET)

As tetraciclinas são derivadas de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, compostos por um núcleo tetracíclico linear aos quais uma variedade de grupos funcionais

estão ligados. As primeiras tetraciclinas descobertas foram a clorotetraciclina e a oxitetraciclina, em 1948, a partir de culturas do *Streptomyces aureofaciens* e *S. rimosus*, respectivamente. Alguns anos mais tarde, outras tetraciclinas foram identificadas, sendo estas obtidas naturalmente de microrganismos ou como produtos de processos semi-sintéticos. A tetraciclina pode ser obtida por fermentação de *Streptomyces aureofaciens*, *S. rimosus* e *S. viridofaciens*, ou por processo semi-sintético a partir da clorotetraciclina (MARINHO, 2005).

É indicado no caso de infecções graves (ósseas, respiratórias, meningite, endocardite e septicemia). Infecções geniturinárias, pielonefrite aguda, prostatites, infecções respiratórias, gastrointestinais, da pele e tecidos moles (incluindo queimadura e feridas infectadas), infecções intra-abdominais e infecções oculares. A dose e duração da terapia dependerão da idade, sensibilidade do microrganismo e gravidade da infecção, e deverão ser ajustados à resposta clínica do paciente, além disso, é contra-indicado para quem apresenta hipersensibilidade aos aminoglicosídeos e pós-operatório imediato (ANVISA, 2007).

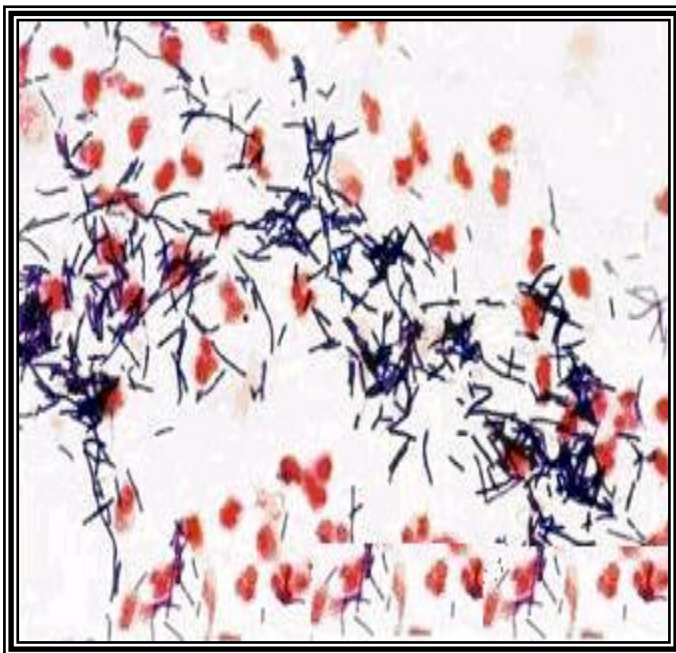
2.8.9 Vancomicina (VAN)

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 heptapeptídeo). 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.*, contra os quais são bacteriostáticos em concentrações usuais, sendo bactericidas em concentração muito elevada (MARINHO, 2005).

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 estafilocócicas e estreptocócica e septicemia bacteriana, sendo contra-indicada para que apresente hipersensibilidade à Vancomicina, gravidez, insuficiência renal e portadores de surdez ou que apresente sinais de perda de audição (TAVARES, 2001).

2.9 Bactérias testadas

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: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* que são Gram positivas (Figura 9), *Serratia marcescens*, *Salmonella* e *Chromobacterium violaceum* que são Gram negativas (Figura 10).

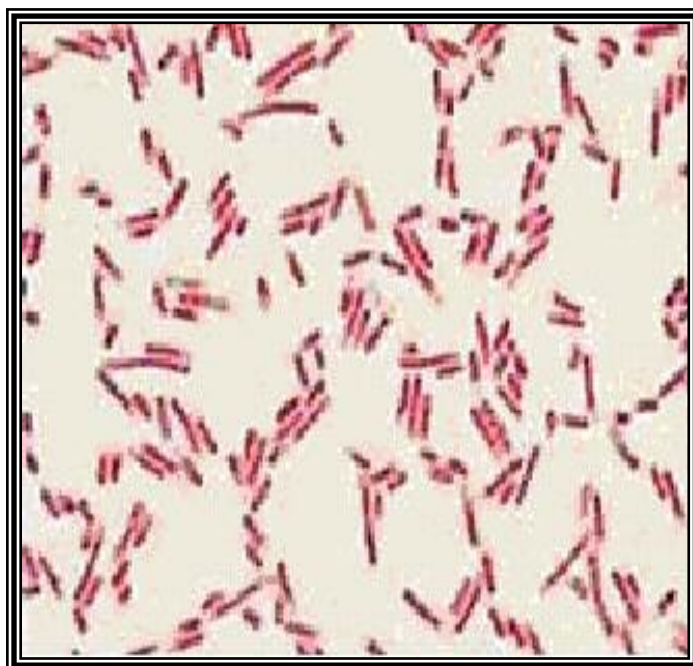


- *Bacillus cereus*
- *Listeria monocytogenes*
- *Enterococcus faecalis*

Fonte: WIKIMEDIA, 2008

Figura 9 - Gram-positivas

- *Serratia marcescens*
- *Salmonella Typhi*
- *Chromobacterium violaceum*



Fonte: WIKIMEDIA, 2008

Figura10 - Gram-negativas

2.9.1 *Bacillus cereus*

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* compreendem um grande número de espécies, estando relatadas aproximadamente 50 espécies diferentes. As bactérias deste gênero caracterizam-se por uma intensa atividade metabólica, já que produzem enzimas que degradam muitos substratos orgânicos. Devido a esta característica, a identificação deste microorganismo é bastante complicada, não havendo um consenso geral sobre a forma de fazê-la (WITCHELL, 2000).

Trata-se de um bacilo Gram-positivo grande, aeróbio, mesófilo, com flagelos peritricos, e produtor de esporos que podem ser centrais ou subterminais. Cepas de *Bacillus cereus* são capazes de utilizar vários carboidratos, além de hidrolisar amido, caseína e gelatina. São catalases positivos e oxidase variável. Todas as cepas são produtores de hemolisinas e de fosfolipases do tipo C. *Bacillus cereus* multiplica-se bem entre 10 e 48°C, apresentando um ótimo de temperatura entre 28 e 35°C. Atividade de água mínima necessária para seu crescimento é 0,95, sendo o crescimento bastante reduzido quando a concentração de

NaCl do meio for de 7,5%. A faixa de pH em de ocorre à multiplicação varia de 4,9 a 9,3 (WITCHELL, 2000).

Bacillus cereus é também encontrado na superfície de carne bovina, suína e de frango, certamente devido à contaminação com o solo. No Brasil, o *Bacillus cereus* tem sido isolado de vários alimentos: queijos, farinhas, amidos, alimentos desidratados, carne moída, com índice de positividade entre 18% e 97% (WITCHELL, 2000).

2.9.2 *Chromobacterium violaceum*

É um bacilo Gram-negativo anaeróbico facultativo, cuja principal característica é produzir um pigmento de cor violeta (violaceína), embora cepas não produtoras de pigmento possam também ser isoladas. Vive na água e no solo e raramente está associado à patologia humana. Casos descritos ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, em geral relacionados ao contato recreacional em lagos e rios. Após o ferimento, onde ocorre a penetração do agente, há um longo período de latência, até que manifestações do tipo septicemia ou abscesso hepático se manifestem. A resistência ocorre à penicilina, ampicilina e cefalotina e costuma haver sensibilidade aos aminoglicosídeos, clorofenicol, tetraciclina e retromicina (TRABULSI, 1999).

2.9.3 *Enterococcus faecalis*

Os enterococcus são amplamente distribuídos na natureza e participam da microbiota normal do homem e de animais. Particularmente, em nível do trato intestinal. Por outro lado, sua participação como agentes etiológicos de infecções humanas e animais é amplamente documentada. Em patologia animal, os enterococcus são associados a infecções diversas, destacando-se mastite e endocardite em bovinos e suínos. Em seres humanos, eles são freqüentemente isolados, em cultura pura ou mista, a partir de infecções clinicamente significativas, tais como bacteremias – acompanhadas ou não de endocardite, infecções dos tratos urinário e biliar, infecções de feridas e infecções pélvicas e intra-abdominal (TRABULSI, 1999).

2.9.4 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é constituído de organismos pequenos, Gram-positivos, com morfologia em forma de cocos e bacilos. São catalase-positivas, oxidase-negativas e fermentam a glicose, produzindo ácido, mas não gás. Além disso, não forma esporos. *Listeria monocytogenes* é um microrganismo ubiqüitária, sendo encontrado em uma ampla variedade de *habitats*, incluindo a microbiota indígena de animais silvestres, ruminantes e seres humanos hígidos (saudáveis).

A bactéria pode utilizar células M ou as criptas de células intestinais como porta de entrada. O diagnóstico de rotina é feito por exame bacteriológico do material proveniente do foco infeccioso. O cultivo primário da bactéria proveniente de sangue líquido aspirado de medula óssea e secreção de garganta pode ser facilitada pelo enriquecimento, com manutenção do meio semeado a 4°C, e subcultivos repetidos em Ágar-sangue. A *Listeria monocytogenes* pode ser transmitida pela placenta, levando ao aborto do feto ou durante o nascimento da criança. As outras várias formas de transmissão são o contato direto com animais doentes e/ou seus excrementos, inalação de poeira e mais freqüentemente pela ingestão de alimentos contaminados. A eliminação de fezes por animais portadores de *Listeria monocytogenes* dissemina-a na natureza, acarretando, principalmente, a contaminação de diversos tipos de alimentos vegetais e animais. No Brasil, as observações mencionadas têm-se concentrado, essencialmente, nos problemas humanos e animal (TRABULSI, 1999).

2.9.5 *Salmonella Thyphi*

A patologia das *Salmonellas* varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro. A *Salmonella typhi* é o agente da febre tifóide, que é caracterizada por febre, dor de cabeça, diarreia, dor abdominal, podendo produzir, ainda, danos respiratórios, hepáticos, esplênicos e/ou neurológicos. As *Salmonellas* paratíficas (A, B e C) causam uma infecção bastante semelhante à febre tifóide. De modo geral, os demais sorotipos de *Salmonella* causam, no adulto normal, apenas uma enterocolite que evolui sem complicações e desaparece dentro de uma semana ou menos. Como estas salmonelas são

geralmente veiculadas por alimentos (principalmente leite e produtos avícolas), a infecção é também denominada toxinfecção de origem alimentar (TRABULSI, 1999).

2.9.6 *Serratia marcescens*

As espécies de *Serratia* produzem as enzimas lipase, gelatinase e dnase que são importantes fatores de sua patogenicidade. A resistência à colistina e à cefalotina é uma característica diferencial adicional (TELES, 2003).

Das três espécies, a *Serratia marcescens* é a mais freqüente, representando 95% das amostras de *Serratia* isoladas de espécimes clínicos. A *Serratia marcescens* é germe causador de infecção hospitalar e, provavelmente, devido à sua múltipla resistência aos antibióticos, sua freqüência tem aumentado nos últimos anos. As infecções causadas por ela podem se localizar em qualquer órgão (TRABULSI, 1999).

Capítulo 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar analiticamente e avaliar a atividade antibacteriana da mistura dos óleos essenciais extraído das folhas da *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos da *Aniba duckei* Kostermans.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair quantitativamente os óleos essenciais das folhas da *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos *Aniba duckei* Kostermans;
- Caracterizar físico-quimicamente a mistura dos óleos essenciais;
- Identificar analiticamente os componentes da mistura de óleos essenciais, usando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e a espectrometria no ultravioleta;
- Quantificar o eugenol e o linalol da mistura dos óleos essenciais por cromatografia gasosa, pelo método da normalização;
- Testar a atividade antibacteriana da mistura de óleos essenciais sobre as bactérias *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* e *Chromobacterium violaceum*, aplicando-se o Método de Difusão em Disco, bem como comparar com a atividade dos padrões de eugenol, linalol e de antibióticos comerciais.

Capítulo 4

PARTE EXPERIMENTAL

Esta 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 – UFMA e da Central Analítica da Unicamp-SP.

4.1 Origem, coleta e preparo da amostra vegetal

As amostras de galhos foram coletadas de três árvores da *Aniba duckei* Kostermans cultivadas na Reserva Florestal Ducke, rodovia AM – 010 km 26 – Manaus – AM – Brasil.

Uma exsicata da espécie *Aniba duckei* Kostermans foi preparada a partir da coleta de três ramos de folhas, com frutos de aproximadamente 30 a 40 cm de comprimento. Em seguida foram colocados em jornais e acondicionados para transporte entre folhas de papelão, presos por um barbante. Estes foram prensados e secos a 37 – 40 °C por 24 horas e depois foram presas e montadas em cartolina na qual foi afixada uma ficha adesiva contendo: nome científico, nome vulgar, família, local de coleta, identificador. Essa exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal do Amazonas.

Para o preparo das exsicatas, foram coletados três ramos de folhas da *Pimenta dióica*, de aproximadamente 30 a 40 cm de comprimento, em seguida foram colocados individualmente em jornais de papelão presas por barbantes. Estas foram prensadas e secas à uma temperatura de 37 a 40°C por 24 a 36 horas, em seguida foram montadas em cartolinas, numeradas e depositadas no Herbário da UFSCar.

As amostras coletadas dos frutos (*Pimenta dioica* Lindl) e dos galhos (*Aniba duckei* Kostermans) foram colocadas para secar em uma sala, por um período de 7 dias. Após o período de secagem utilizou de um moinho elétrico Tenal, modelo TE-340 do pavilhão tecnológico da UFMA para trituração dos frutos e dos galhos isoladamente. Após a moagem o material em pó foi armazenado em frascos de polietileno para posterior extração dos respectivos óleos essenciais.

4.2 Extrações dos óleos essenciais

Para extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e da *Aniba duckei* Kostermans, utilizou-se o Sistema de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e uma manta elétrica como fonte geradora de energia (Figura 11). A cada extração do óleo essencial, peso-se 30g dos frutos moídos da *Pimenta dioica* Lindl e também 30g de galhos moídos da *Aniba duckei* Kostermans e adicionou-se 300 mL de água destilada. Em seguida, destilava-se por 3 horas e meia. Os óleos eram secos por meio de percolação em Na_2SO_4 anidro. Essas etapas foram realizadas em triplicatas e as amostras eram armazenadas em recipientes de vidro sobre refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. O rendimento da extração foi calculado na relação massa/volume, observando o volume obtido no próprio sistema de extração e em seguida transformando para massa/massa utilizando-se a densidade de óleos.



Figura 11 - Sistema Clevenger.

4.3 Características físico-químicas do óleo essencial

Na caracterização das propriedades físico-químicas dos óleos essenciais realizou-se as análises de densidade, solubilidade em etanol a 70% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.3.1 Densidade

A densidade da mistura de óleos essenciais foi obtida e determinada com o emprego de um picnômetro de 1,0 mL previamente seco, tarado e aferido. Em seguida era cheio com as amostras do óleo essencial a 25 °C e então pesado.

4.3.2 Solubilidade em etanol (70%)

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

4.3.3 Índice de refração

As leituras eram feitas a 25 °C com o óleo colocado diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, para o qual era utilizada uma micropipeta.

4.3.4 Cor

A técnica utilizada foi visual, foi avaliado visualmente comparando-se a cor da mistura de óleos essenciais com cores conhecidas e sobre um fundo branco, com as cores conhecidas e descritas na literatura especializada.

4.3.5 Aparência

A técnica empregada, também nesse caso, foi a visual na qual se fez uma comparação das essências no que diz respeito à sua transparência ou limpidez por testes sensoriais.

4.4 Análises químicas da mistura de óleos essenciais

4.4.1 Análise por espectrofotometria no UV-Vis

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo “Cary 50” da Hewlett Packard. 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.

4.4.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Analisou-se a mistura de óleos essenciais CG-EM no cromatógrafo à gás QP 5000, coluna capilar - 1 de metil silicone entre-cruzada (30 m x 0,25 mm i.d.; 0,25 µm de espessura de filme), acoplado a um detector seletivo de massas HP 5MS de impacto eletrônico, com uma energia de 70 eV, temperatura de transferência de 280 °C. Para as análises foram

injetados 0,3 µL de solução em diclorometano e efetuaram-se as medidas fixando-se às seguintes condições: temperatura inicial: 40 °C, final: 300 °C, tempo inicial: 5 min., final: 7,5 min., rampa: 8 °C min.⁻¹, gás de arraste: He, solvente: solução em diclorometano.

4.5 Padrões de eugenol e linalol

No presente estudo foram usados padrões concentrados de eugenol e linalol os quais foram gentilmente fornecidos pela Indústria Dierberger de Óleos Essenciais S.A.

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

4.6 Testes biológicos usando a mistura de óleos essenciais

4.6.1 Microrganismos testados

As cepas de *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Thyphi* e *Chromobacterium violaceum*. Submetidas aos testes de resistência aos antibióticos, aos padrões de eugenol, linalol e a mistura de óleos essenciais, foram isoladas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Maranhão e cedidas pela Prof^a. Dr^a. Adenilde Ribeiro Nascimento.

4.6.2 Antibiogramas

As cepas foram submetidas ao teste de suscetibilidade pelo Método Bauer-Kirby de multidiscos para antibiogramas. 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 4.6.1 e testados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby, o procedimento foi o seguinte:

4.6.2.1 Preparo do inóculo

As culturas bacterianas foram inoculadas em caldo BHI (Brain and Heart Infusion) que após 24 horas de incubação a 37 °C foi diluído até obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (10^8 microrganismos/mL).

4.6.2.2 Inoculação das placas

Umedeceu-se um swab na suspensão obtida, removendo o excesso de inóculo, e semeou-se na placa de Agar Müeller-Hinton, incubando-a, subseqüentemente, por 24 horas a 37°C.

4.6.2.3 Dispersão dos discos

Com uma pinça estéril, foram distribuídos os discos na placa, pressionando-os ligeiramente sobre o Agar, logo após 37°C por 24 horas.

4.6.2.4 Antibióticos testados

Os antibióticos utilizados, devidamente impregnados em discos já prontos, foram os seguintes: Ampicilina, 10 mg/L (AMP 10), Cefotaxina, 30 mg/L (CTX 30), Cefoxitina, 30 mg/L (CFO 30), Eritromicina, 15mg/L (ERI 15), Gentamicina, 15 mg/L (GEN 15), Novobiocina 5 mg/L (NOV 5) Penicilina 10mg/L (PEN 10), Tetraciclina, 30 mg/L (TET 30) e Vancomicina, 30 mg/L (VAN 30). Os halos de inibição foram comparados com tabelas do CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, para posterior classificação dos microrganismos em relação aos antibióticos testados.

4.6.2.5 Leitura dos resultados

O inóculo de cada cultura bacteriana (0,10 mL) foi semeado com swab estéril na superfície das placas contendo Agar Mueller Hinton solidificado.

Sobre este foram aderidos, com auxílio de uma pinça previamente flambada, pequenos discos de papel de filtro de 6 mm impregnados, individualmente, com 75 µL do óleo essencial e com os padrões (eugenol e linalol), sendo em seguida pressionados levemente sobre a superfície do meio.

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

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físicas da mistura dos óleos essenciais

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

Os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais dos frutos de *Pimenta dioica* Lindl dos galhos da *Aniba duckei* Kostermans e da mistura de óleos (Tabela 1), apresentaram similaridade com os padrões. Este fato era esperado uma vez que a mistura foi preparada na proporção de 1:1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das espécies *Pimenta dioica* Lindl e *Aniba duckei* Kostermans comparadas com a mistura de óleos essenciais.

Parâmetros Físico-químicos	<i>Pimenta dioica</i> Lindl ^a	<i>Aniba duckei</i> Kostermans ^b	Mistura de óleos Essenciais ^c
Densidade (g mL ⁻¹)	0,949	0,866	0,904
Solubilidade em etanol a (70%)	1:2	1:2	1:2
Índice de refração (N _D 25°)	1,332	1,466	1,379
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido
Odor	Ctco	Ctco	Ctco

^(a)Monteiro (2008); ^(b)Teles (2003); ^(c)Trabalho em estudo

5.2 Análises espectrofotométricos da mistura de óleos essenciais na região do ultravioleta – visível

No presente trabalho utilizou-se a espectrofotometria de UV-Vis tanto para investigar a presença do eugenol e linalol na mistura de óleos essenciais, bem como para a sua caracterização eletrônica.

Os espectros de absorção na região da ultravioleta, para a mistura de óleos essenciais (A), para a solução etanol/água a 60% em volume (B), para o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans (C) e para o óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl (D) são apresentados na Figura 12.

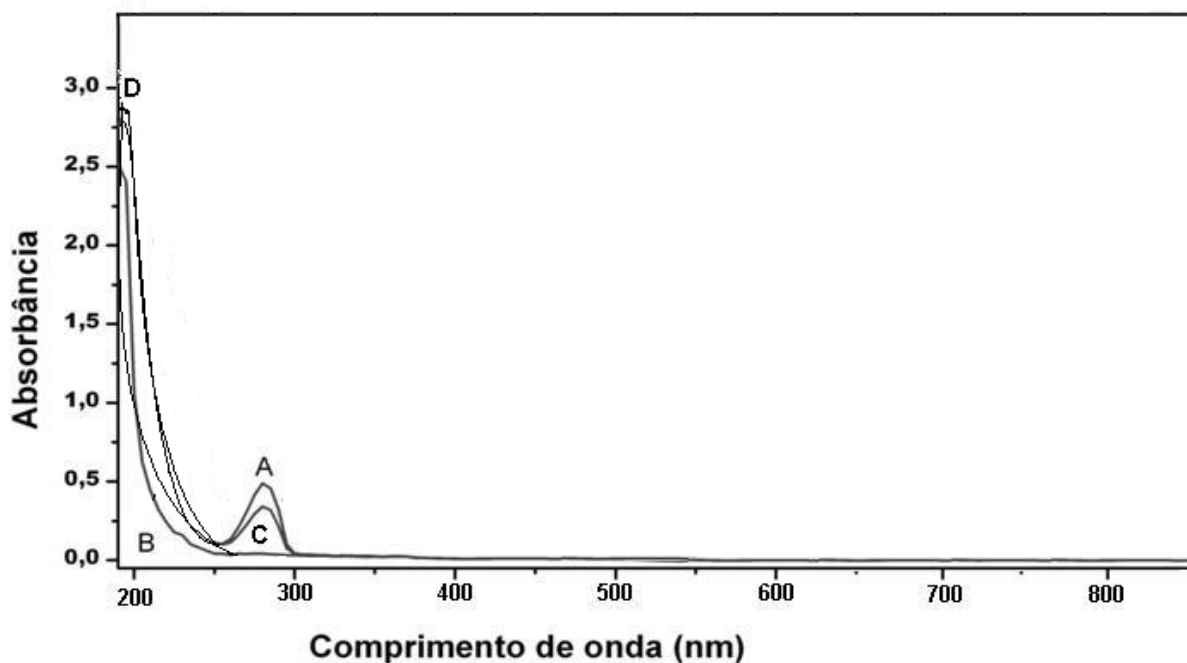


Figura 12 - Espectros de absorção no UV-Vis. (A) padrão de eugenol; (B) mistura etanol/água à 60%; (C) mistura de óleos essenciais; (D) padrão de linalol.

Nessa análise espectrofotométrica, a solução de etanol/água a 60% em volume foi escolhida após um estudo sobre a solubilidade dos óleos essenciais em várias concentrações dessa solução.

Na Figura 12, essas bandas podem ser atribuídas à presença de compostos alifáticos insaturados (230 nm) e a compostos aromáticos com substituição auxocrômica (280 nm) como o grupo hidroxila, sendo que ambas com transições eletrônicas*, embora unidades fenilpropílicas apresentem bandas com máximo de absorção no mesmo intervalo dos comprimentos de onda observados (UGAZ, 1994; SILVERSTEIN *et al*, 2007). No entanto, ao se comparar o espectro da mistura de óleos essenciais com os espectros dos padrões de eugenol e linalol, nota-se que os mesmos praticamente se sobrepõem, indicando que o eugenol e o linalol encontram-se presente na mistura de óleos essenciais como componentes majoritários.

5.3 Análises por cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível identificar sete constituintes da mistura de óleos essenciais, os quais são apresentados na Figura 13, seguindo a ordem de eluição.

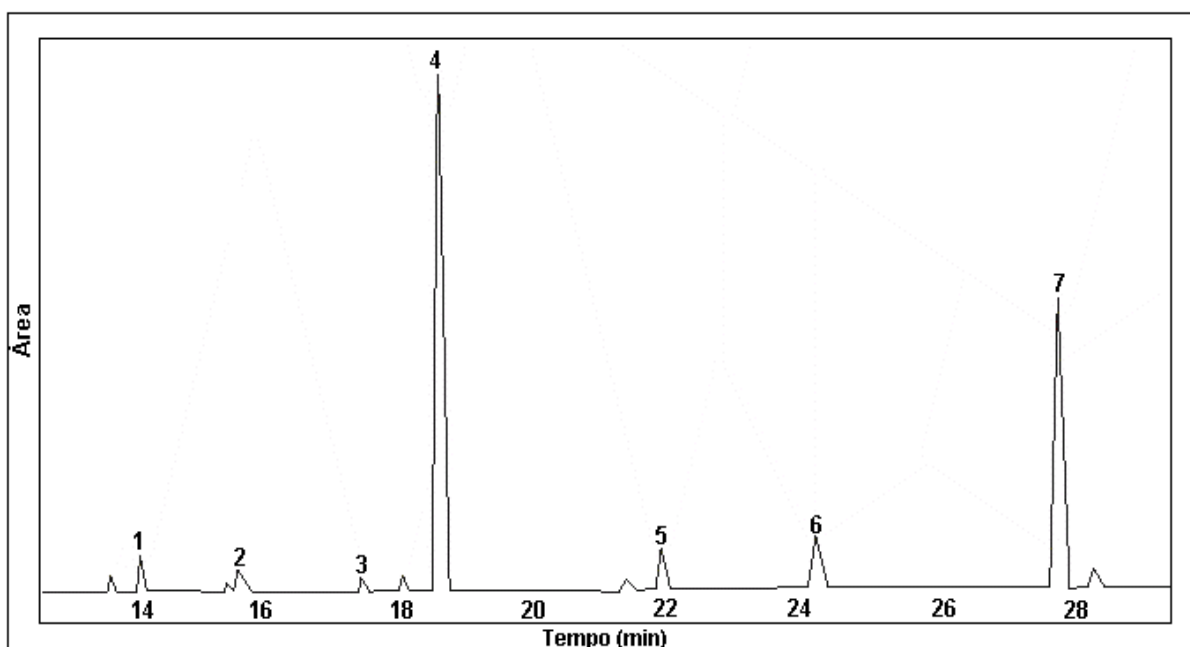


Figura 13 - Cromatograma da mistura de óleos essenciais.

Figura 13 apresenta sete picos cromatográficos, sendo que o pico cromatográfico 1 é o β -mirceno, cujo tempo de retenção 14,16 min; o pico cromatográfico 2 é o Limoneno,

cujo tempo de retenção 15,61 min; o pico cromatográfico 3 é 5-Eteniltetrahydro-5-Trimetil-2-Furanmetanol, cujo tempo de retenção 17,42 min; o pico cromatográfico 4 é o Linalol, cujo tempo de retenção 18,62 min; o pico cromatográfico 5 é o Terpincol, cujo tempo de retenção 21,86 min; o pico cromatográfico 6 é o Alilfenol, cujo tempo de retenção 24,15 min; e o pico cromatográfico 7 é o Eugenol, cujo tempo de retenção 27,73 min.

A Tabela 2 mostra a identificação de cada pico apresentados na Figura 13, assim como o seu tempo de retenção na coluna e o respectivo teor na mistura de óleos essenciais, sendo que a quantificação dos sete picos cromatográficos foi determinada pela integração da área do pico correspondente. Nota-se que o linalol (61,57%), e o eugenol (28,83%), caracterizando serem estes os componentes majoritários.

Tabela 2 - Composição química da mistura de óleos essenciais.

Pico	TR ^a (min)	Substância identificada	Teor (%)
1	14,16	β-Mirceno	2,50
2	15,61	Limoneno	1,08
3	17,42	5-Eteniltetrahydro-5-Trimetil-2-Furanmetanol	0,79
4	18,62	Linalol	61,57
5	21,86	Terpincol	2,15
6	24,15	Alilfenol	3,09
7	27,73	Eugenol	28,83

A seguir são discutidos os sete picos cromatográficos da Tabela 2 que se apresentaram com seus respectivos teores.

O pico 1 da Figura 13 foi identificado, segundo a espectroteca NIST02 e a literatura (ADAMS, 2001), como sendo o β- mirceno de fórmula C₁₀H₁₆ e massa molecular correspondente a 136 g mol⁻¹ (Figura 14). Esse hidrocarboneto monoterpênico apresenta o pico molecular m/z 136 e o pico intenso em m/z 93, o qual é referente à estrutura C₇H₉⁺ formada por isomerização, seguida de clivagem alílica (SILVERSTEIN *et al*, 2007).

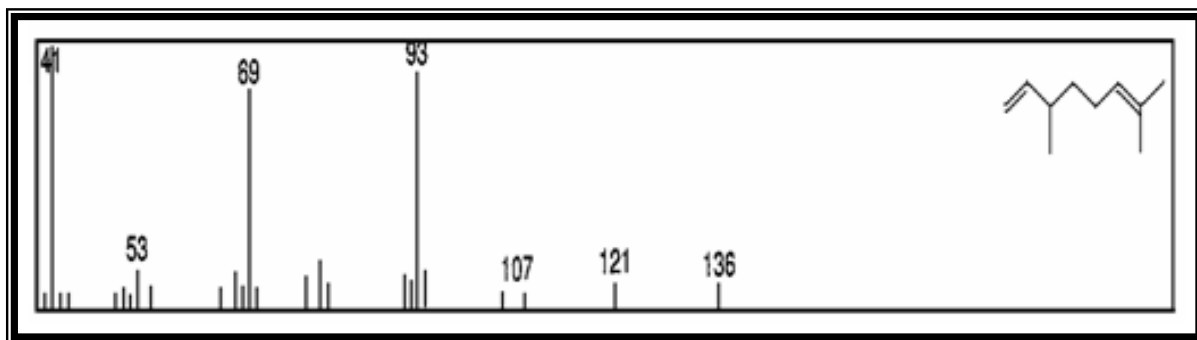


Figura 14 - Espectros de massas do β -mirceno.

De acordo com o banco de dados da espectroteca NIST02 e de padrões constantes na literatura (ADAMS, 2001), o pico 2 da Figura 13 corresponde ao limoneno, C₁₀H₁₈, evidenciado pela presença do íon molecular m/z=136 observado no espectro de massas da Figura 15.

O referido espectro de massas mostra ainda picos característicos de hidrocarbonetos: o pico m/z 121 [M-15] é referente à perda do grupo metila, enquanto que os picos m/z 107 [M-15-14] e m/z 93 [M-15-14-14] são decorrentes da subsequente perda do grupo metileno. O aparecimento do pico com m/z 68 (C₅H₈⁺) pode ser decorrente da quebra das ligações carbono-carbono semelhantemente à reação *retro*-Diels-alder, o qual é bastante comum em alquenos cíclicos, resultando ainda numa molécula neutra, conforme demonstrado na Figura 16 (SILVERSTEIN *et al*, 2007).

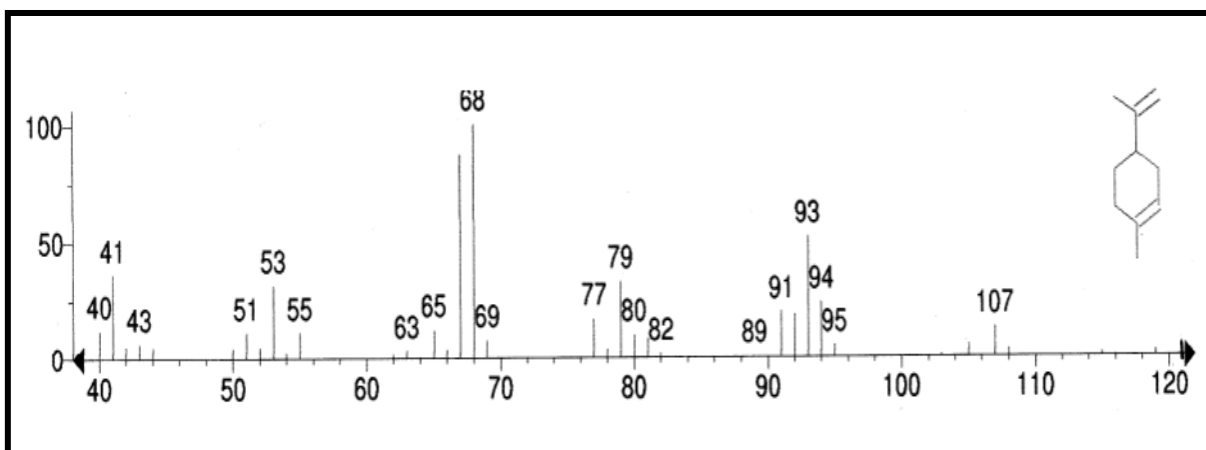


Figura 15 Espectros de massas do Limoneno.

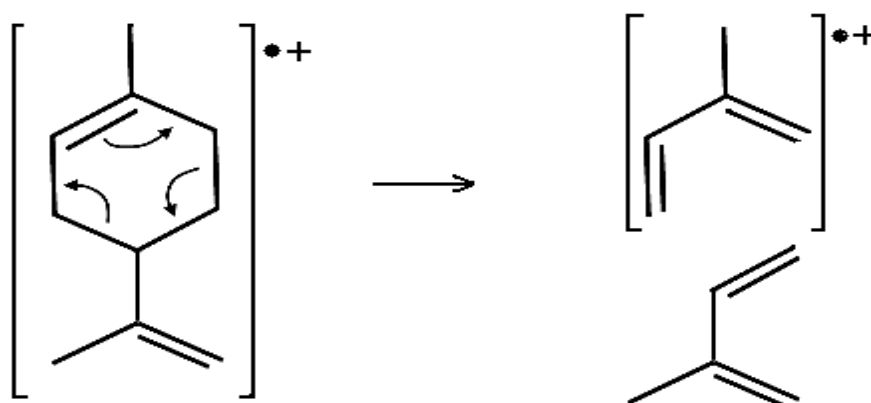


Figura 16 Ocorrência da reação de *retro*-Diels-Alder na fragmentação do limoneno.

Serve como parâmetro para a proposta de identificação através do espectro da Figura 17, apresenta porcentagem de área normalizada a qual a distribuição relativa dos compostos na amostra que corresponde a 0,79%, cujos pico de massa igual a 51 e a base do pico igual a 59.

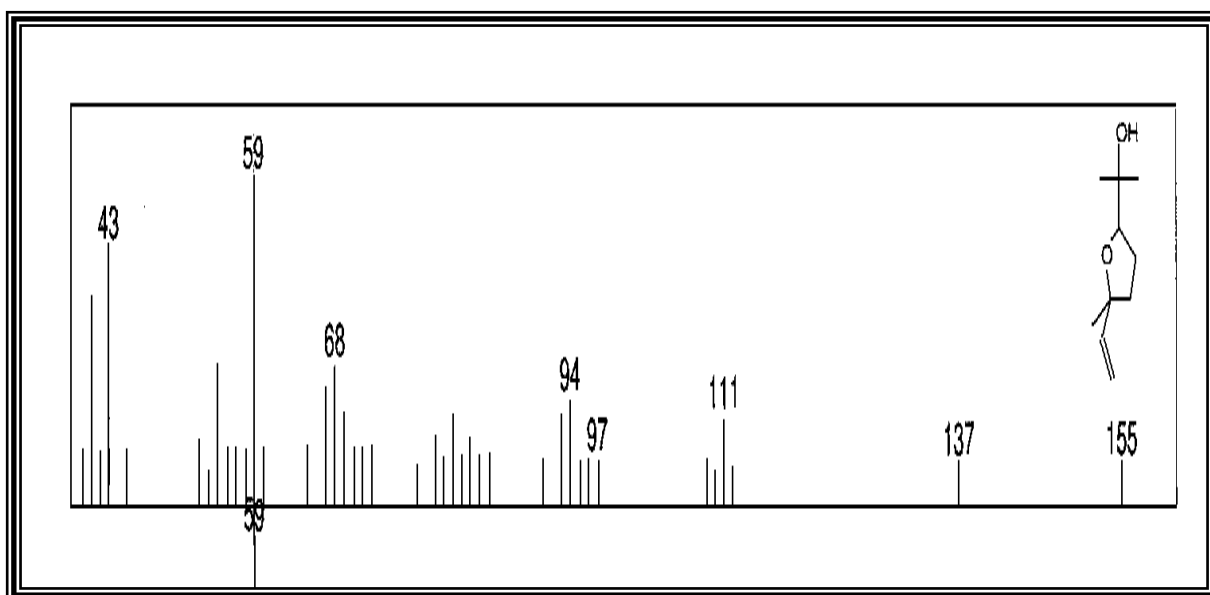


Figura 17 - Espectros de massas do 5-Eteniltetrahydro-5-Trimetil-2-Furanmetanol.

O espectro de massa da Figura 18 foi relacionado ao linalol, percebe-se que o pico do íon molecular $m/z = 154$ (o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade), confirmado como $C_{10}H_{18}O$ a sua fórmula molecular, de baixa intensidade, característico dos alcoóis terciários. Os picos $m/z = 136$ [M-18] e $m/z = 121$ são característicos da perda de água e do grupo metila, respectivamente.

Para alcoóis terciários, ocorre freqüentemente a quebra de ligação C-C vizinha do átomo de oxigênio, com eliminação do maior grupo, o que fica evidenciado no pico de $m/z=71$ ($H_2C=CH-COH^+-CH_3$) e pelo pico de $m/z=83$. O pico com $m/z=93$ é devido a eliminação de água e do grupo C_3H_8+ [M-44]. (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2006).

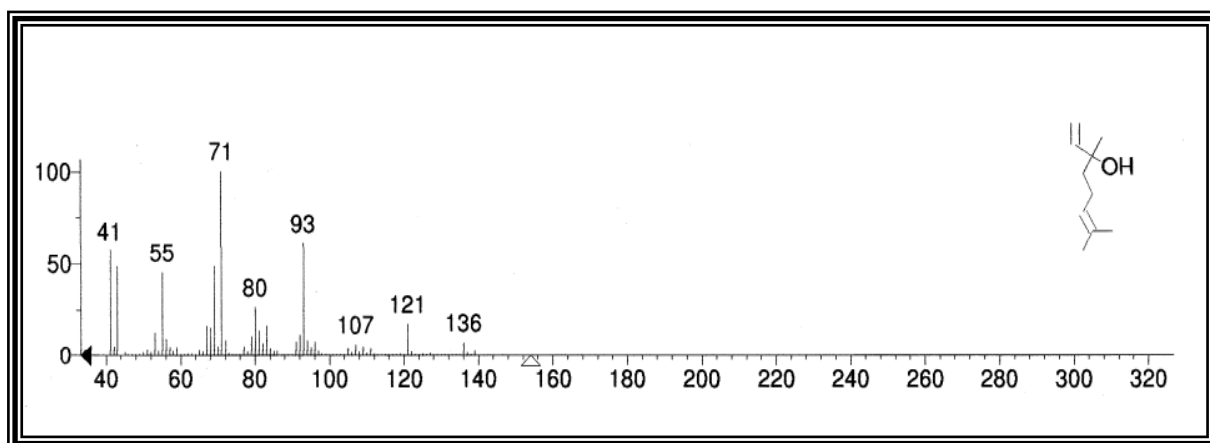


Figura 18 - Espectros de massas do Linalol.

O espectro de massas da Figura 19 serve como parâmetro para a proposta de identificação do íon-molecular, está situado no ponto em que a relação $m/z = 154$, afirmando a fórmula $C_{10}H_{18}O$, que caracteriza o álcool terciário chamado de terpinol. O pico $m/z = 136$ é devido à perda de água, que frequentemente ocorre pela decomposição térmica de alcoóis superiores nas paredes quentes da câmara de injeção, (SILVERSTEIN.; BASSLER.; MORRILL, 2006). O pico $m/z = 121$ é resultante da perda de água e de grupo metila, característica de alcoóis terpênicos.

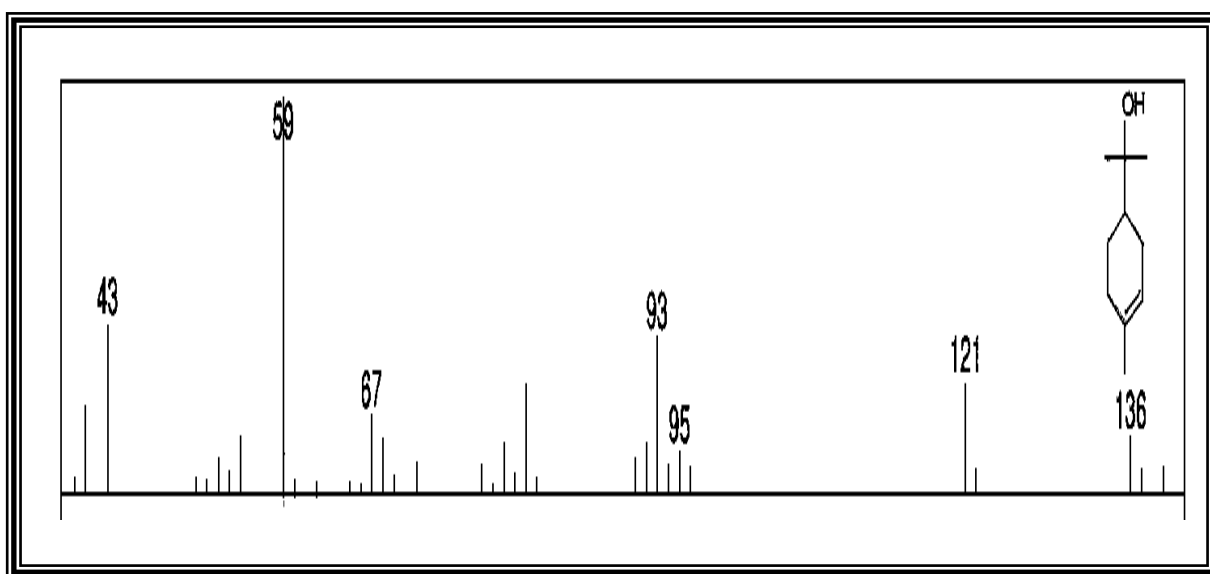


Figura 19 - Espectros de massas do Terpinol.

Serve como parâmetro para a proposta de identificação através do espectro da Figura 20, refere-se ao espectro de massas do Aliffenol. O pico do íon molecular apresenta $m/z=134$, com pico base de $m/z=133$, característico de fenóis substituídos.

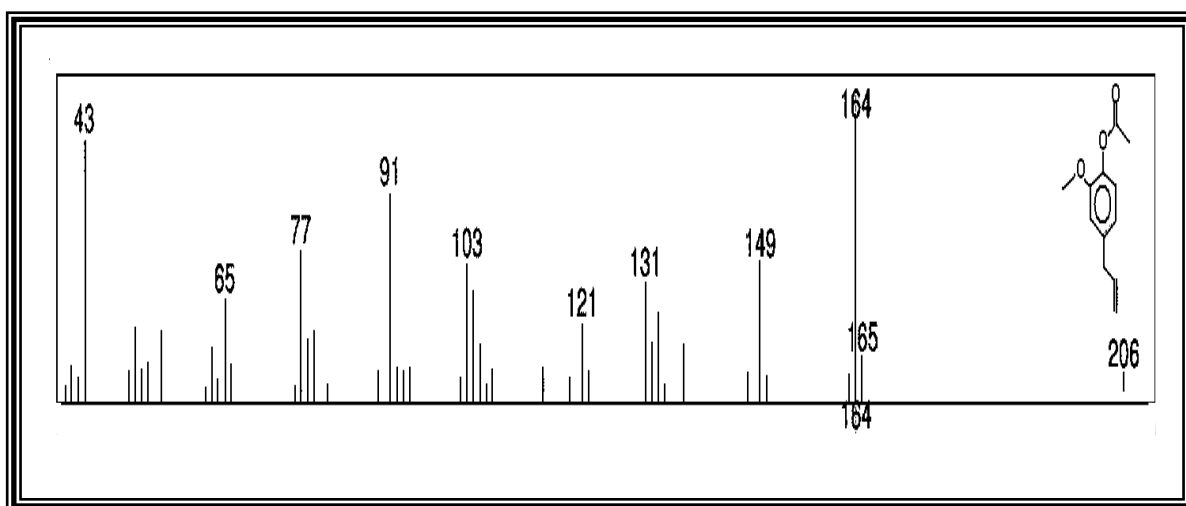


Figura 20 - Espectros de massas do Aliffenol.

O espectro de massas da Figura 21 serve como parâmetro para a proposta de identificação das massas apresenta o pico do íon molecular $m/z = 164 [M^+]$, confirmando como $C_{10}H_{12}O_2$ a fórmula do eugenol. Para fenóis, é comum o pico de o íon molecular ser também o pico base, como é o caso do eugenol. O pico $m/z = 149 [M-15]$ é característico da perda do radical metila (CH_3) e o pico $m/z = 77$ é característico do íon ($C_6H_5^+$).

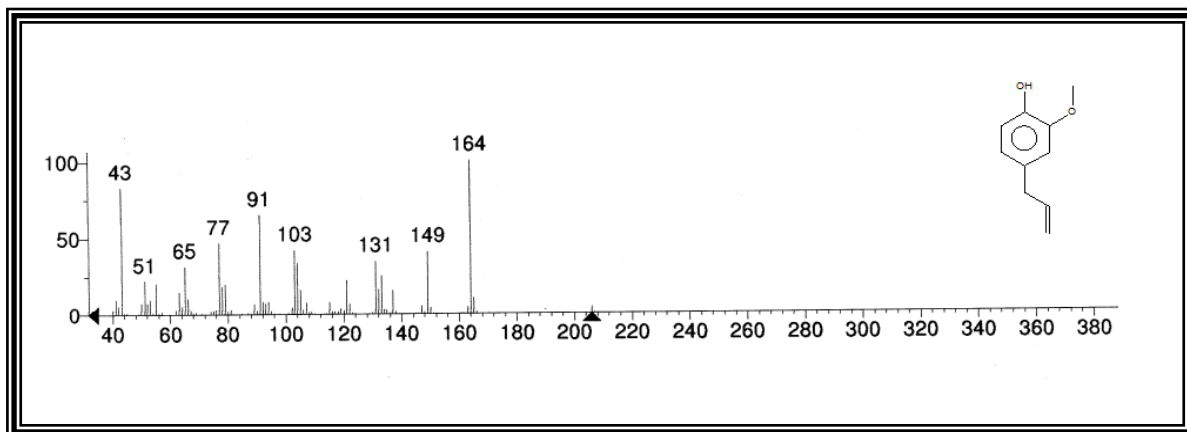


Figura 21 - Espectros de massas do Eugenol.

5.4 Antibiogramas

A atividade antimicrobiana da mistura de óleos essenciais pelo método da difusão em disco (MDD) em relação às bactérias *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella thyphi* e *Chromobacterium violaceum*.

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

De acordo com os parâmetros estabelecidos em Tabela padrão do CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute para comparação de antibiogramas e classificação das bactérias em resistentes (R), moderadamente sensíveis (MS) ou sensíveis (S), pelo método de Bauer-Kirby organizou-se a Tabela 3

Tabela 3. Zonas de inibição em relação aos antibióticos testados

ANTIBIÓTICOS	CONCENTRAÇÃO $\mu\text{g/L}$	HALO DE INIBIÇÃO (mm)		
		R	MS	S
Ampicilina (AMP)	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefotaxima (CTX)	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Cefoxitina (CFO)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Eritromicina (ERI)	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicina (GEN)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Novobiocina (NOV)	5	nt	nt	nt
Penicilina (PEN)	10	nt	nt	nt
Tetraciclina (TET)	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Vancomicina (VAN)	30	≤ 9	10-11	≥ 12

^{nt}: não testado

5.4.1 Antibiograma para o *Bacillus cereus*

Os resultados do teste de difusão em discos para *Bacillus cereus* estão dispostos nas Figuras 22 e 23, nas quais se percebe que essa bactéria é sensível aos antibióticos Eritromicina, Ampicilina e Tetraciclina, pois, de acordo com os dados do CLSI, são sensíveis a esses antibióticos os microrganismos que apresentarem halo ≥ 23 mm, para Eritromicina, para Ampicilina halo ≥ 17 mm, e para Tetraciclina halo ≥ 19 mm, já para a Penicilina não foi encontrado nenhum intervalo de inibição de crescimento no CLSI, e *Bacillus cereus* apresentou os halos de inibição 22, 23, 25 e 27 mm, respectivamente, frente a esses antibióticos. (Figura 27).



Figura 22 - Antibiograma *B. cereus* (ERI;TET)

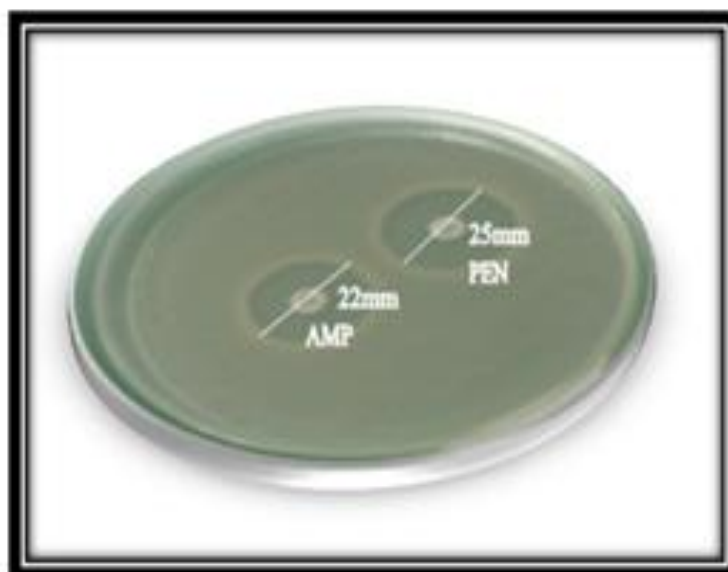


Figura 23 - Antibiograma *B. cereus* (AMP; PEN;)

Para *Bacillus cereus* a mistura de óleos essenciais dos galhos *Aniba duckei* Kostermans e dos frutos *Pimenta dioica* Lindl não foi mais eficiente que todos antibióticos testados que apresentaram os seguintes halos de inibição 21, 22, 23 e 25 mm, respectivamente aos antibióticos Tetraciclina, Ampicilina, Eritromicina e Penicilina, toda via manteve uma ação bactericida satisfatória apresentando um halo de inibição de 20 mm, conforme a Figura 24.

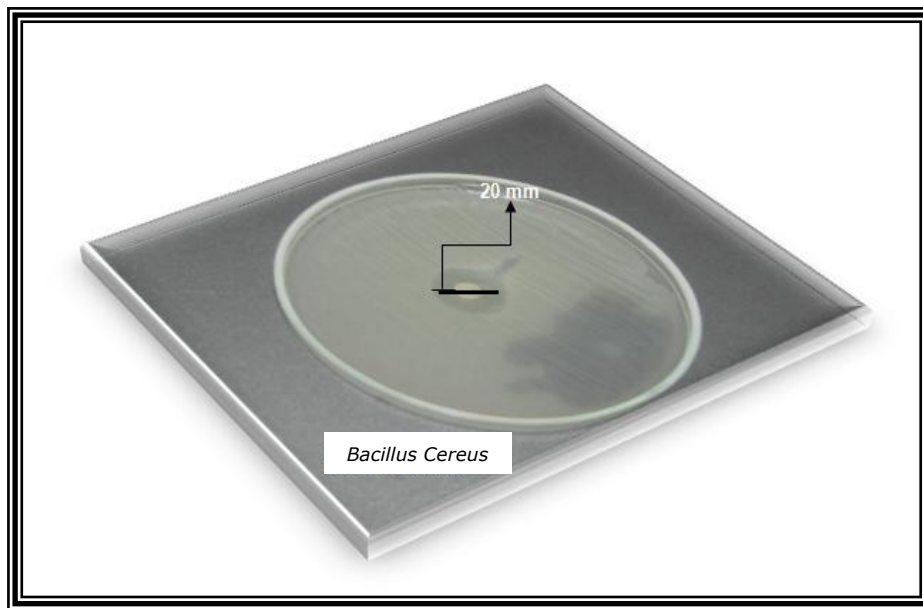


Figura 24 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Bacillus cereus* causado pela mistura de óleos essenciais.

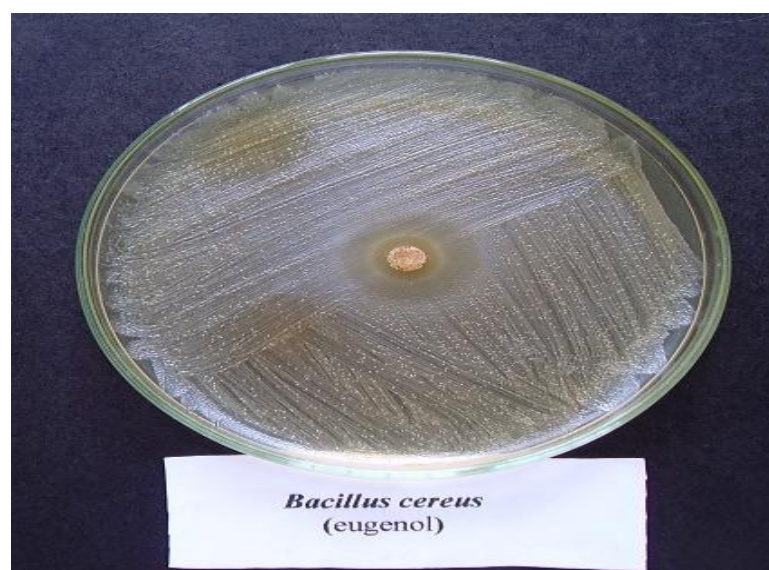


Figura 25 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Bacillus cereus* causado pelo padrão de eugenol.

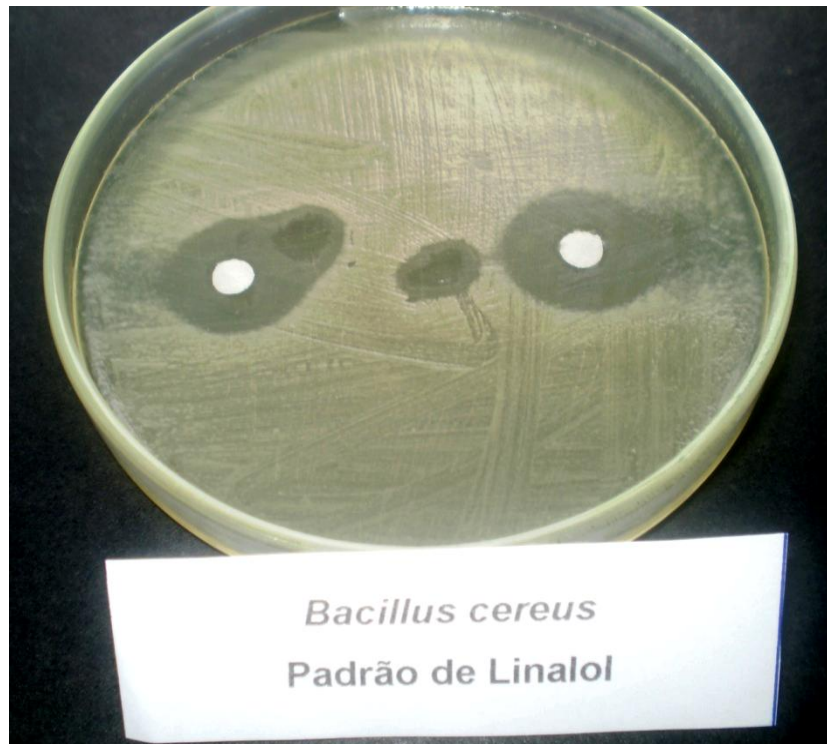


Figura 26 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Bacillus cereus* causado pelo padrão de linalol.

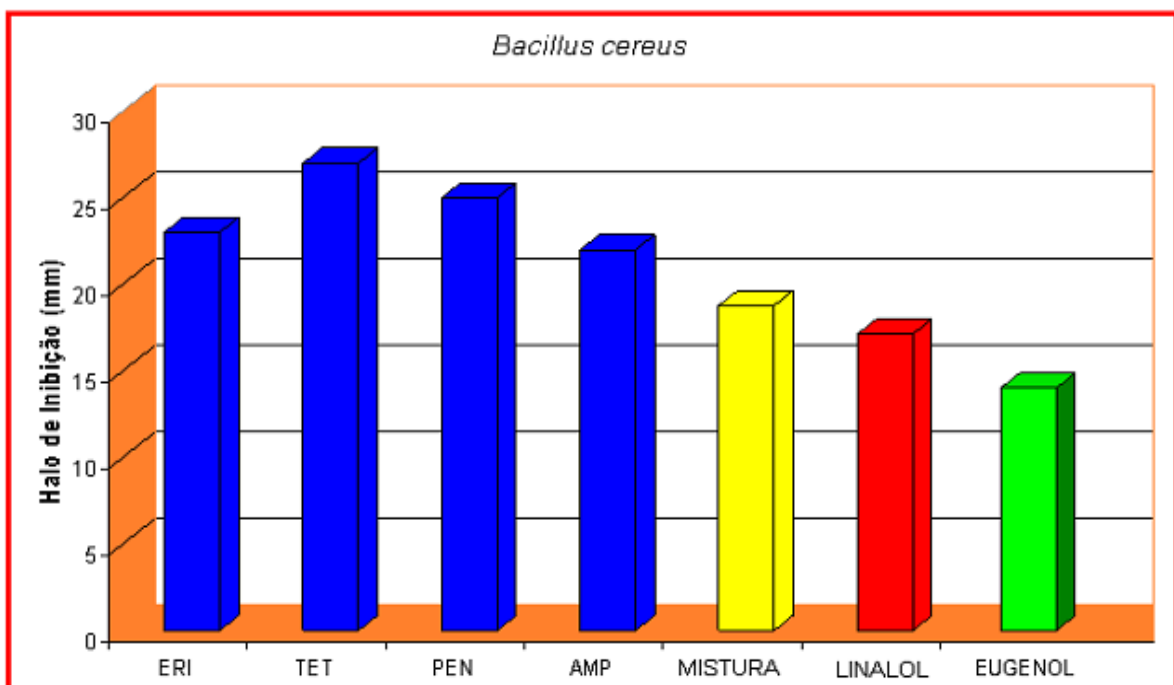


Figura 27- Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria *Bacillus cereus*, em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby.

5.4.2 Antibiograma para o *Chromobacterium violaceum*

Para os antibióticos testados, o *Chromobacterium violaceum* foi a bactéria que mais apresentou resistência, tendo sido os fármacos Vancomicina, Eritromicina e Tetraciclina, apresentaram todos os halos de inibição 0 mm. Já para a Gentamicina é considerado sensível, pois seu halo foi de 15 mm. Segundo o CLSI é sensível para halo ≥ 15 mm. (Figura 28, 29 e 33).



Figura 28 - Antibiograma *C. violaceum* (GEN; VAN;)

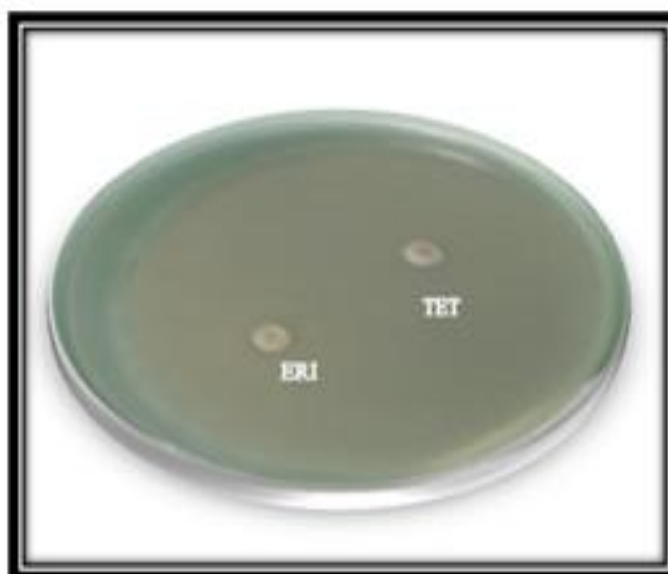


Figura 29 - Antibiograma *C. violaceum* (ERI; TET;)

Para *Chromobacterium violaceum* a mistura de óleos essenciais dos galhos *Aniba duckei* Kostermans e dos frutos *Pimenta dioica* Lindl foi mais eficiente que todos os antibióticos testados, pois a Vancomicina, Eritromicina e Tetraciclina que não apresentaram halos de inibição. Já o antibiótico Gentamicina, que apresentou inibição do crescimento com um halo de inibição de 15 mm, não demonstrou resistência comparada com halo de inibição de 20 mm da mistura. Conforme Figura 30.

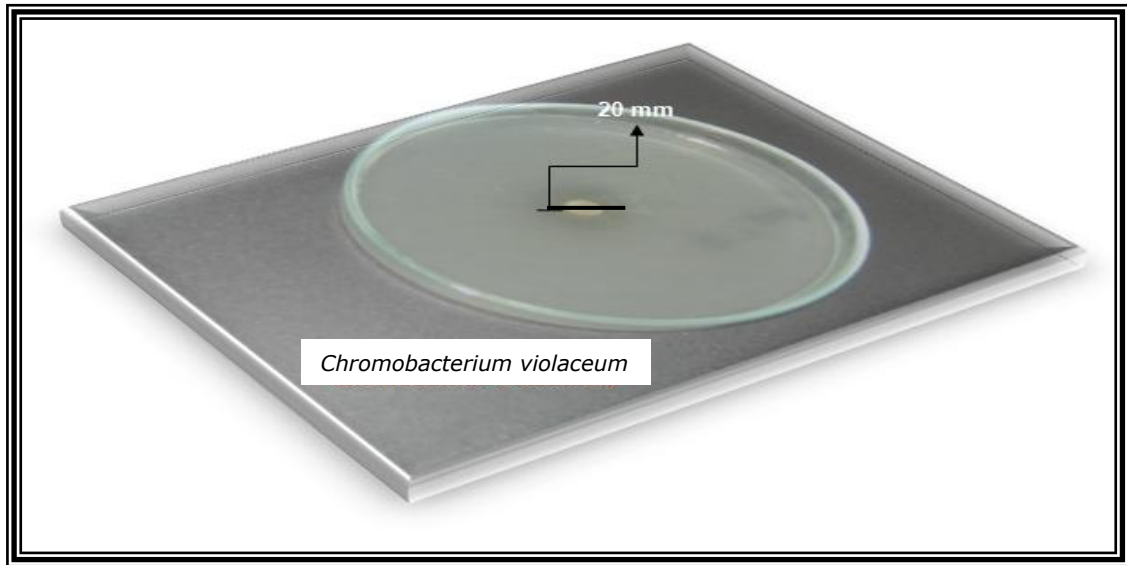


Figura 30 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Chromobacterium violaceum* causado pela mistura de óleos essenciais.



Figura 31 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Chromobacterium violaceum* causado pelo padrão de eugenol

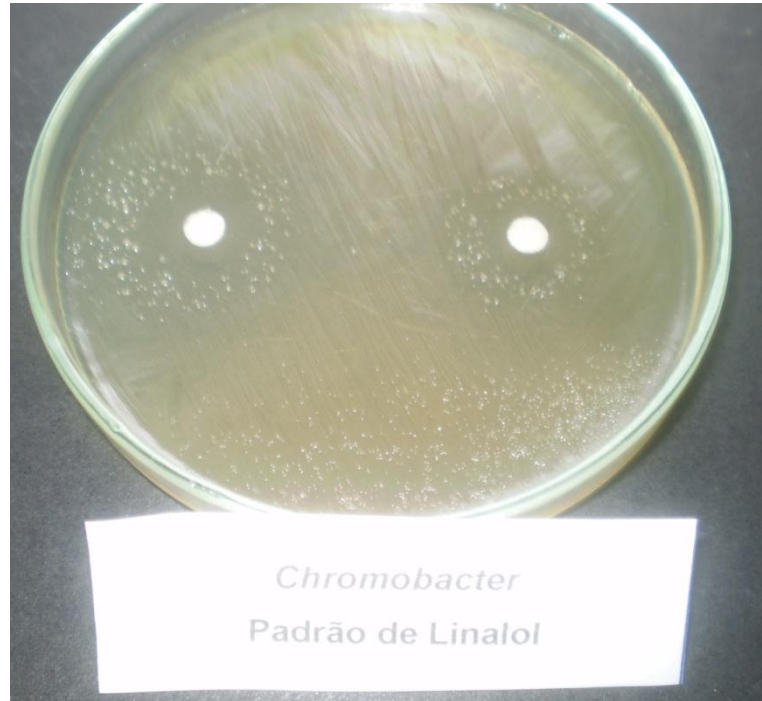


Figura 32 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Chromobacterium violaceum* causado pelo padrão de linalol.

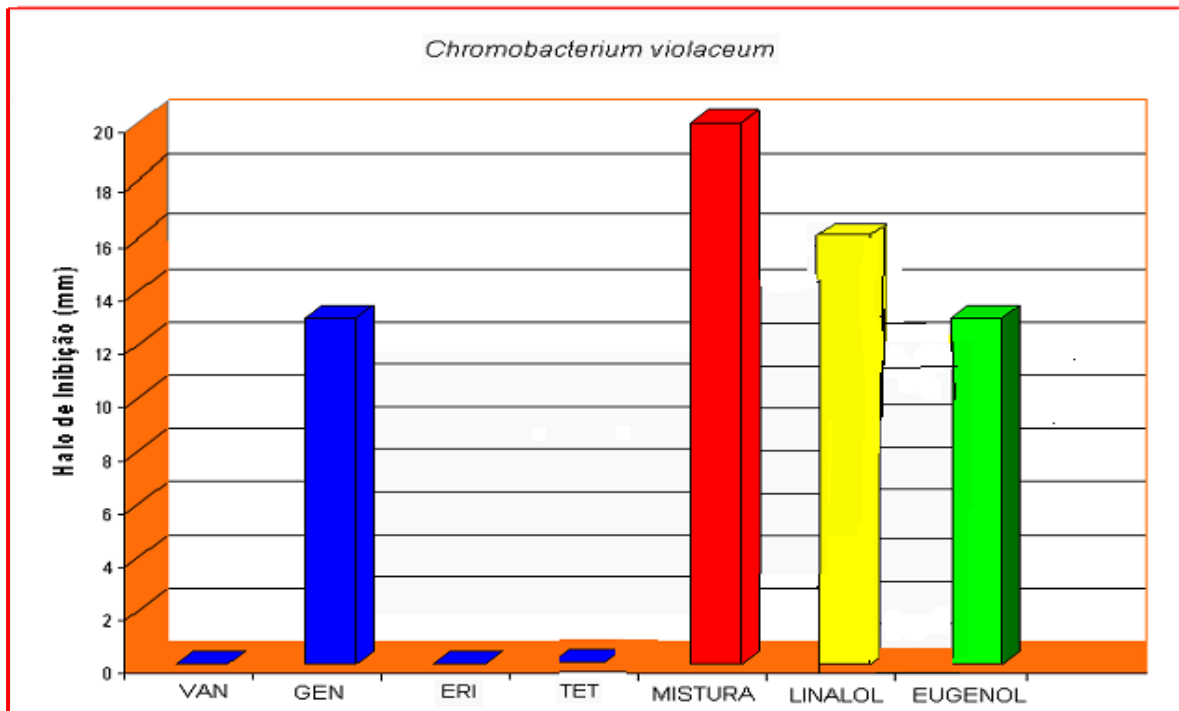


Figura 33 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria *Chromobacterium violaceum*, em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby.

5.4.3 Antibiograma para o *Enterococcus faecalis*

Para os antibióticos testados, o *Enterococcus faecalis* foi a bactéria que não apresentou inibição de crescimento para os antibióticos Vancomicina e Penicilina. Já com os fármacos Ampicilina e Gentamicina apresentaram halo de crescimento de 12 e 13 mm, respectivamente, o primeiro é classificado como resistente e o segundo moderadamente sensível. (Figura 34 e 35).

Esses halos de inibição de crescimento mostram também que a bactéria *Enterococcus faecalis* apresentou-se moderadamente sensível à Gentamicina, com halo de inibição de 13 mm. E para a Ampicilina apresentou-se resistente, cuja zona de inibição foi de 12 mm (Figura 39).



Figura 34 - Antibiograma *E. faecalis* (VAN; GEN)



Figuras 35 - Antibiograma *E. faecalis* (PEN; AMP)

Para *Enterococcus faecalis* a mistura de óleos essenciais dos galhos *Aniba duckei* Kostermans e dos frutos *Pimenta dioica* Lindl foi mais eficiente que todos os antibióticos testados, pois a Vancomicina, Penicilina, Ampicilina. Sendo que não apresentaram halos de inibição os dois primeiros e o último apresentou halo de inibição de 12 mm logo moderadamente sensível. Já o antibiótico Gentamicina que apresentou um halo de inibição de 13 mm, demonstrou resistência, todavia a eficácia da mistura foi maior com halo de inibição de 20 mm da mistura. Conforme Figura 36.

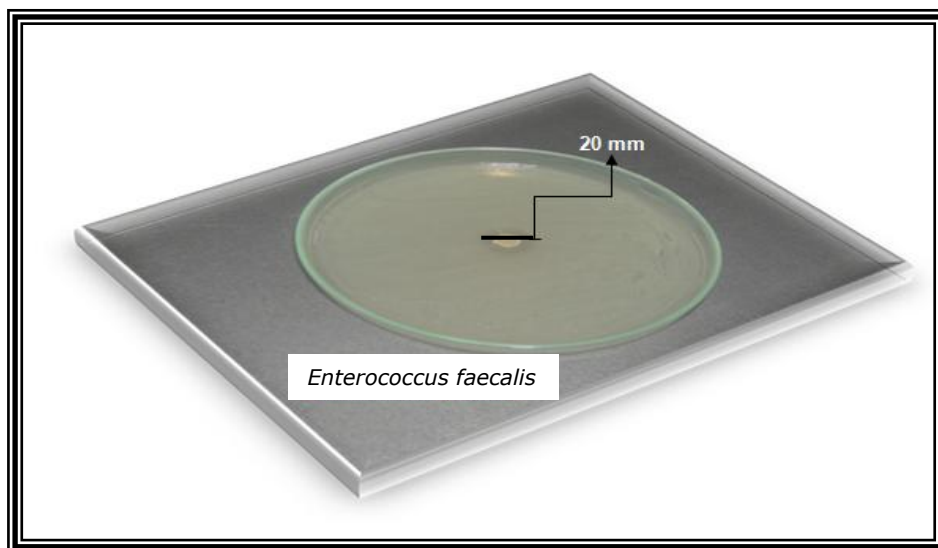


Figura 36 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Enterococcus faecalis* causado pela mistura de óleos essenciais.

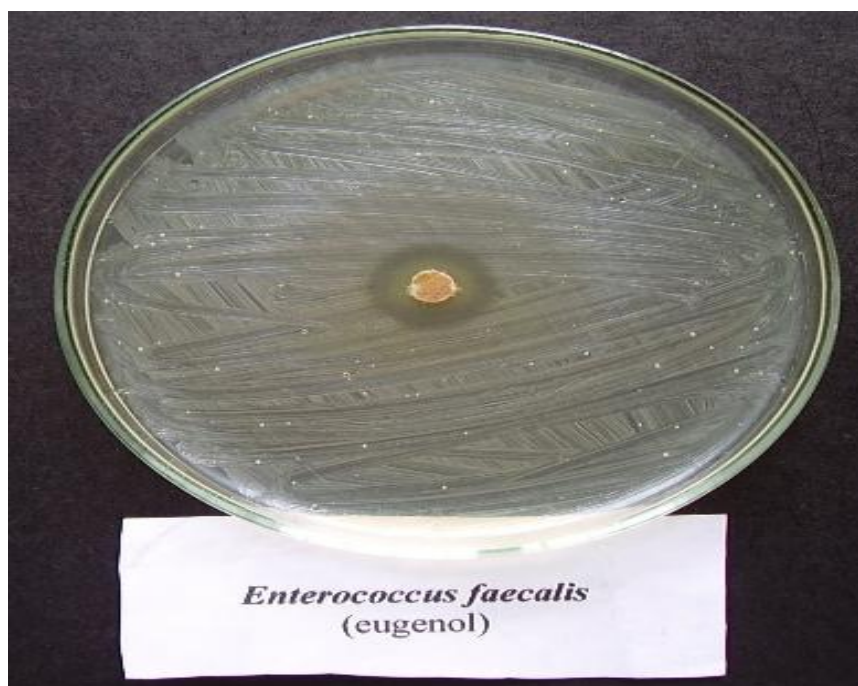


Figura 37 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Enterococcus faecalis* causado pelo padrão de eugenol.

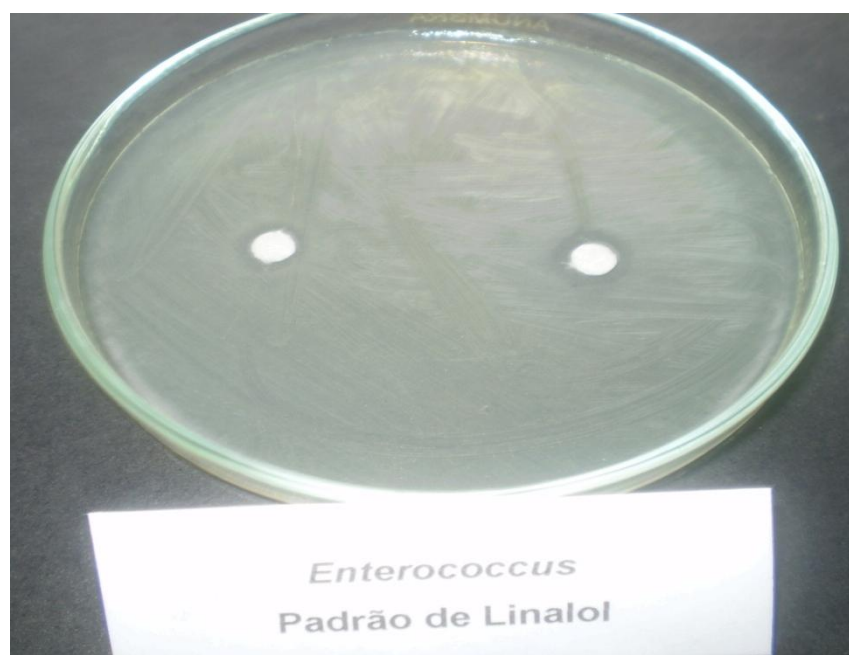


Figura 38- Halo de inibição de crescimento da bactéria *Enterococcus faecalis* causado pelo padrão de linalol.

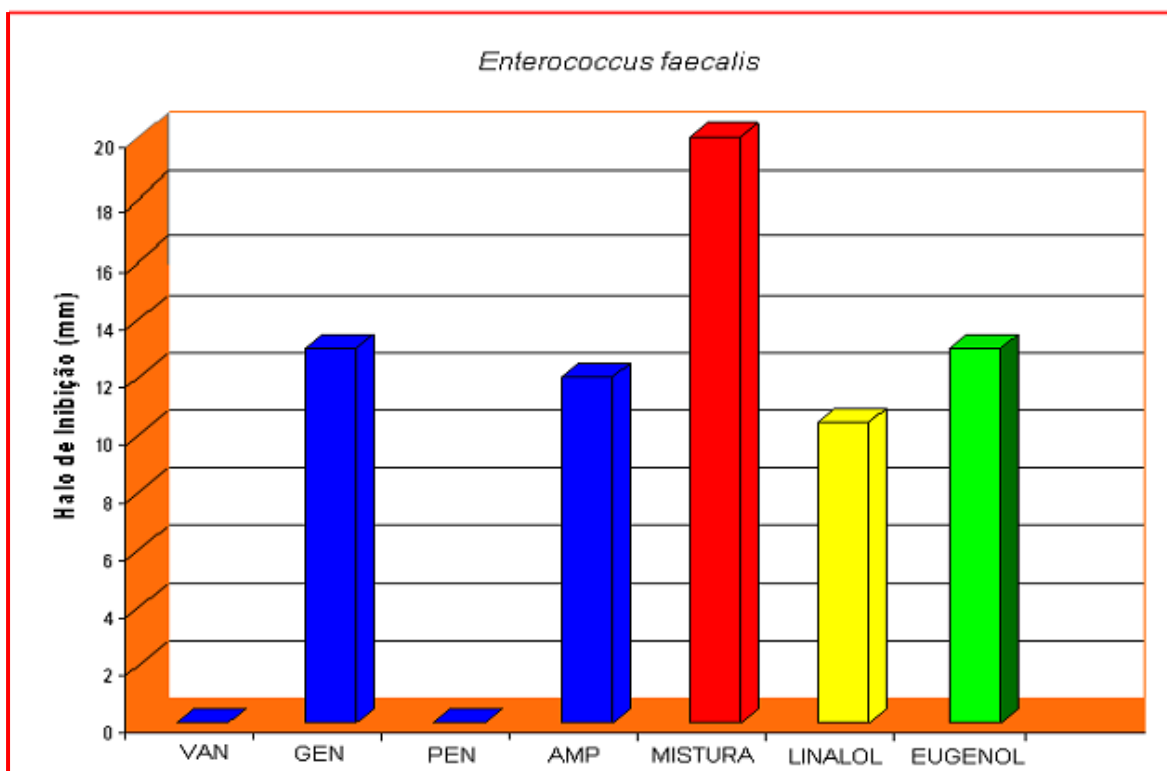


Figura 39 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria *Enterococcus faecalis*, em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby.

5.4.4 Antibiograma para a *Listeria monocytogenes*

Pela análise das Figuras 40 a 41, é possível notar que não houve halo de inibição no teste de disco da *Listeria monocytogenes* para o antibiótico Tetraciclina, Penicilina, Eritromicina e Vancomicina o que representa resistência da bactéria a esse medicamento.

De acordo com os dados obtidos, foi evidenciado ainda que a *Listeria monocytogenes* não se mostrou sensível a nenhum dos antibióticos analisados. Os resultados discutidos neste item, referentes ao antibiograma da bactéria *Listeria monocytogenes*, foram organizados também na Figura 42 a qual mostra com bastante clareza que a Tetraciclina, Penicilina, Eritromicina e Vancomicina não inibiram essa bactéria.



Figura 40 - Antibiograma *L. monocytogenes* (TET; PEN)



Figura 41 - Antibiograma *L. monocytogenes* (ERI; VAN)

Para *Listeria monocytogenes* a mistura de óleos essenciais dos galhos *Aniba duckei* Kostermans e dos frutos *Pimenta dioica* Lindl foi mais eficiente que todos os antibióticos testados, pois a Vancomicina, Eritromicina e Tetraciclina Penicilina. Sendo que não apresentaram halos de inibição os três primeiros e o último apresentou o efeito bacteriostático. A eficácia da mistura foi bastante significativa com halo de inibição de 13 mm da mistura. Conforme Figura 42.

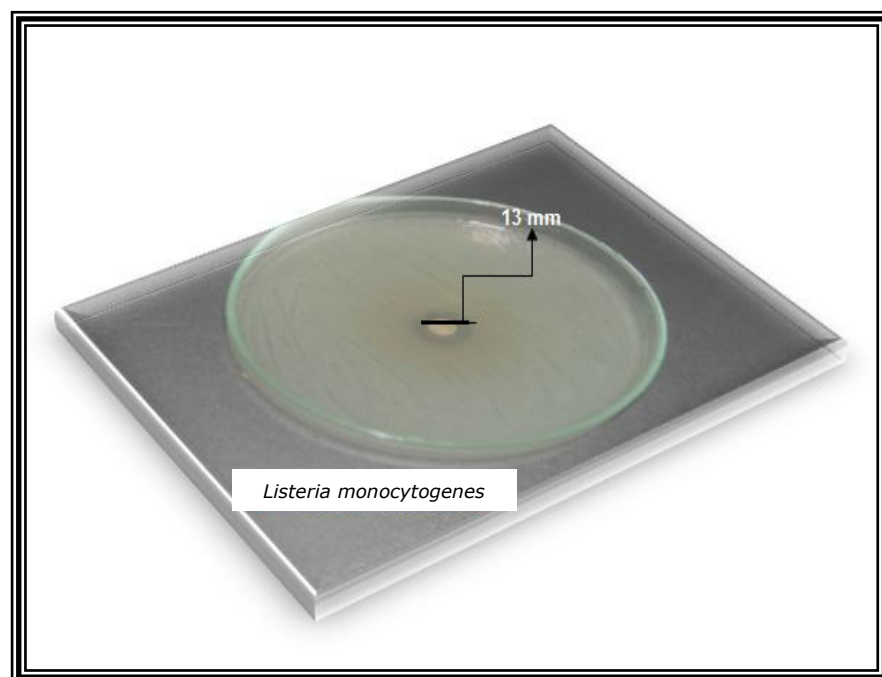


Figura 42 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes* causado pela mistura de óleos essenciais.



Figura 43 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes* causado pelo padrão de eugenol.



Figura 44 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes* causado pelo padrão de linalol.

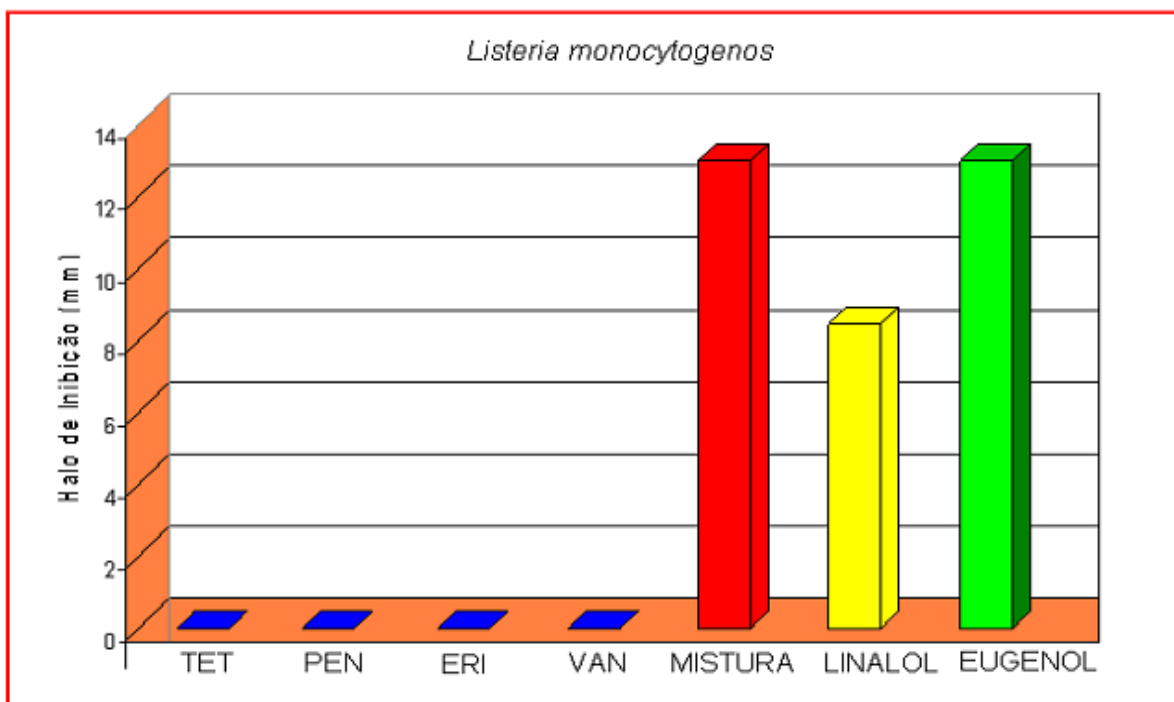


Figura 45 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes*, em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby.

5.4.5 Antibiograma para a *Salmonella Thyphi*

A *Salmonella thyphi* apresentou-se moderadamente sensível aos antibióticos Cefoxitina, Tetraciclina e Cefotaxima para quem apresentou halo de inibição de 17, 18 e 22 mm, respectivamente, sendo que o CLSI diz que uma bactéria é moderadamente sensível, quando apresenta halo no intervalo de [15-17], [15-18], [15-22] mm (Figura 45, 46 e 50). Enquanto que a Ampicilina apresentou sensibilidade em relação a Penicilina, com halo de inibição de 21 mm, o CLSI caracteriza esse antibiótico como sensível ao apresentar halos maior ou igual 17 mm. Em relação a Novobiocina o seu halo foi de 0 mm.



Figura 46 - Antibiograma *S. thyphi* (CFO; CTX)

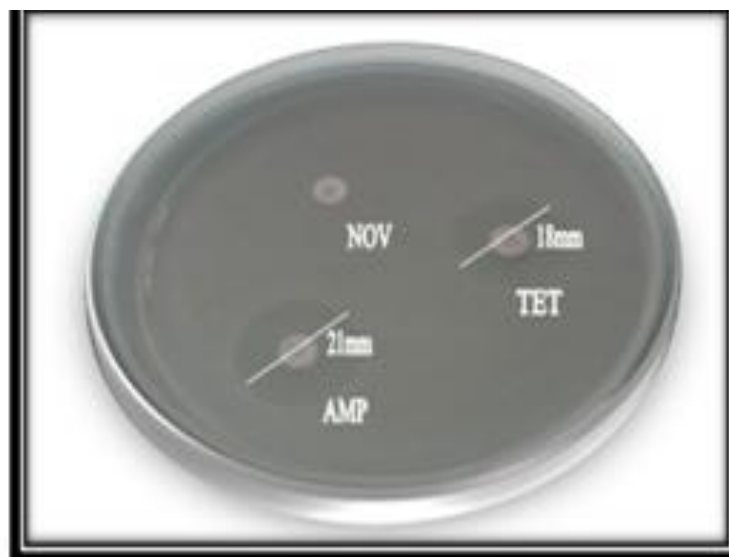


Figura 47 - Antibiograma *S. thyphi* (AMP; NOV; TET)

Para *Salmonella thyphi* a mistura de óleos essenciais dos galhos *Aniba duckei* Kostermans e dos frutos *Pimenta dioica* Lindl foi menos eficiente que a maioria dos antibióticos testados que apresentaram halos de inibição de 17, 18, e 22 mm correspondendo aos seguintes antibióticos Cefotaxima, Tetraciclina e Cefoxitina respectivamente, todavia a mistura apresentou um halo de inibição de 11 mm, conforme (Figura 47), sendo mais eficiente que o antibiótico Novobiocina que não apresentou um halo de inibição. Dentre os antibióticos testados o que apresentou maior halo de inibição foi a Cefotaxima com 22 mm.

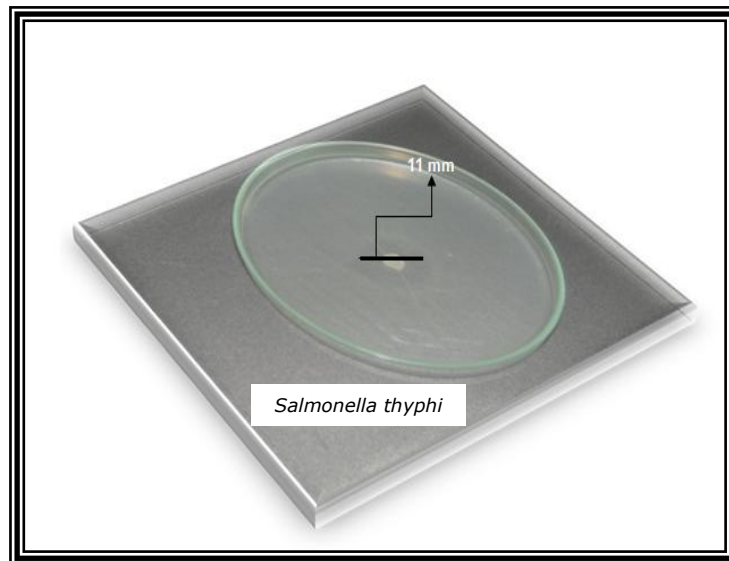


Figura 48 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Salmonella thyphi* causado pela mistura de óleos essenciais.



Figura 49 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Salmonella thyphi* causado pelo padrão de eugenol

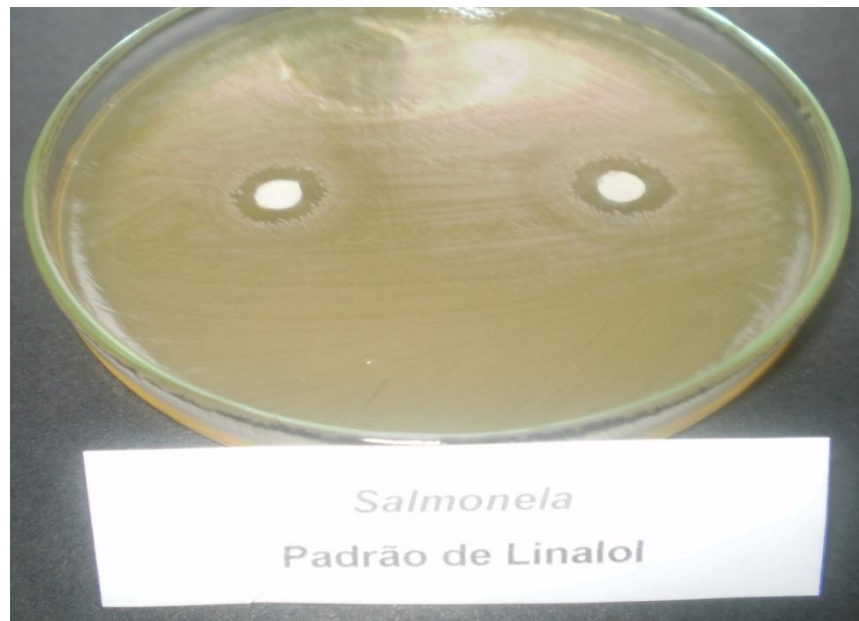


Figura 50 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Salmonella typhi* causado pelo padrão de linalol.

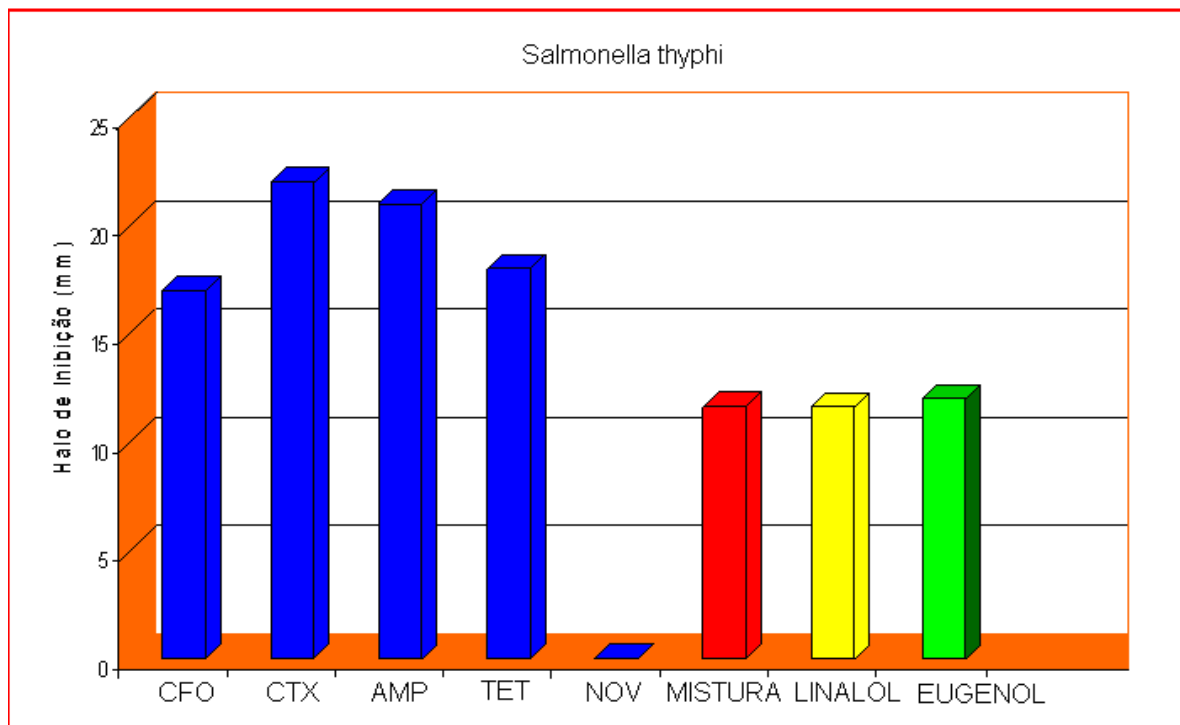


Figura 51 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria *Salmonella Thyphi*, em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby.

5.4.6 Antibiograma para a *Serratia marcescens*

Os antibiogramas da *Serratia marcescens*, representados nas Figuras 51 e 52 mostraram que a bactéria é sensível em relação aos antibióticos Ampicilina e Cefotaxima, com halo de inibição de 17 e 30 mm, respectivamente, e moderadamente sensível em relação a Cefoxitina, com halo de 15 mm, tornando se resistente com relação a Tetraciclina, que apresentou halo de 0 mm (Figura 56).

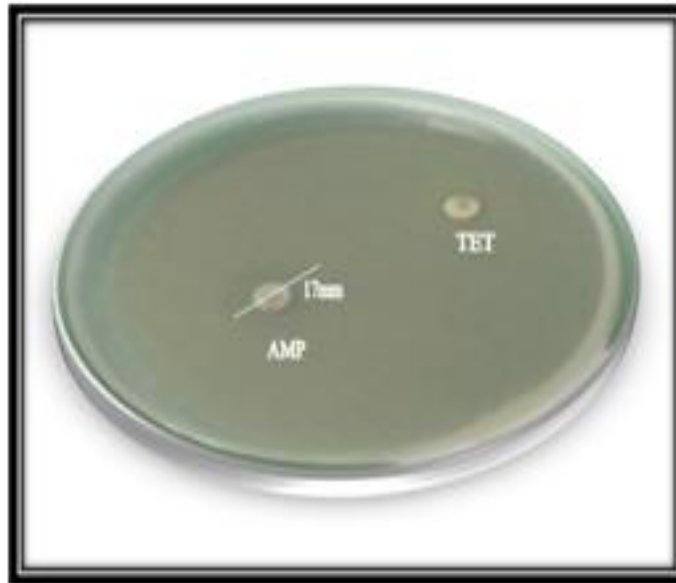


Figura 52 Antibiograma *S. marcescens* (AMP; TET)

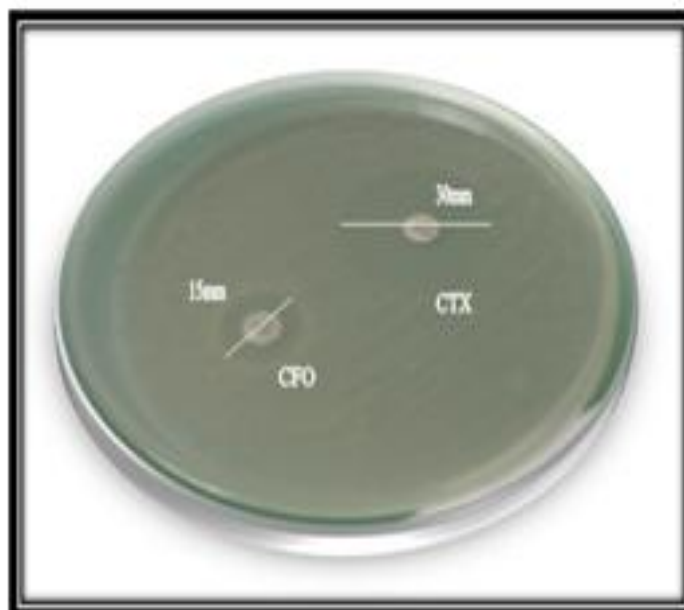


Figura 53 Antibiograma *S. marcescens* (CFO; CTX)

Para *Serratia marcescens* a mistura de óleos essenciais dos galhos *Aniba duckei* Kostermans e dos frutos *Pimenta dioica* Lindl não foi mais eficiente que a maioria os antibióticos testados que apresentaram os seguintes halos de inibição 15, 17 e 30mm, respectivamente aos antibióticos Cefoxitina, Ampicilina e Cefotaxima, todavia manteve uma ação antibacteriana satisfatória apresentando um halo de inibição de 14 mm, conforme a Figura 53, superando a Tetraciclina que não apresentou halo de inibição.

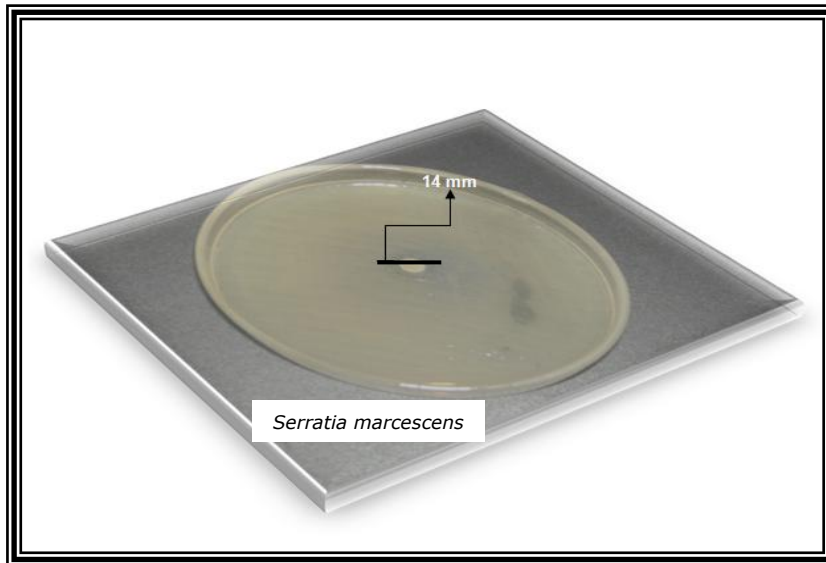


Figura 54 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Serratia marcescens* causado pela mistura de óleos essenciais.

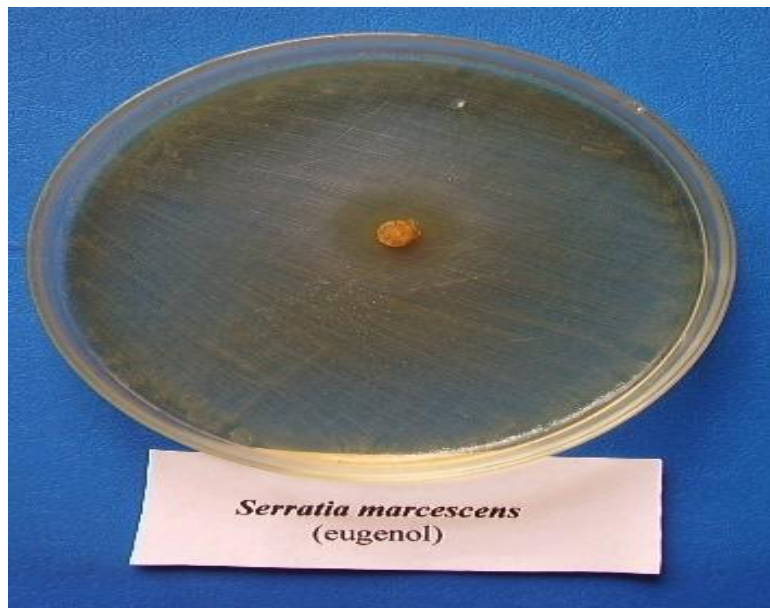


Figura 55 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Serratia marcescens* causado pelo padrão de eugenol.

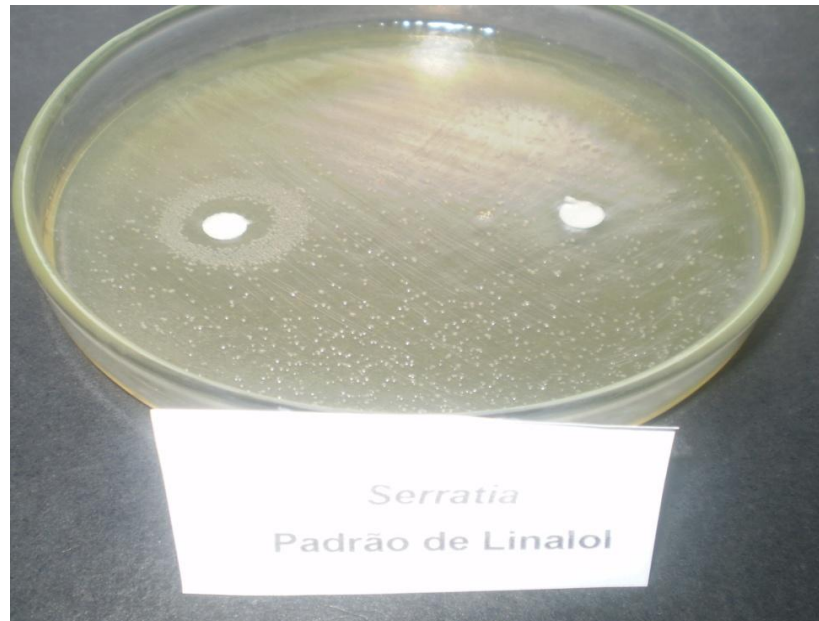


Figura 56 - Halo de inibição de crescimento da bactéria *Serratia marcescens* causado pelo padrão de linalol.

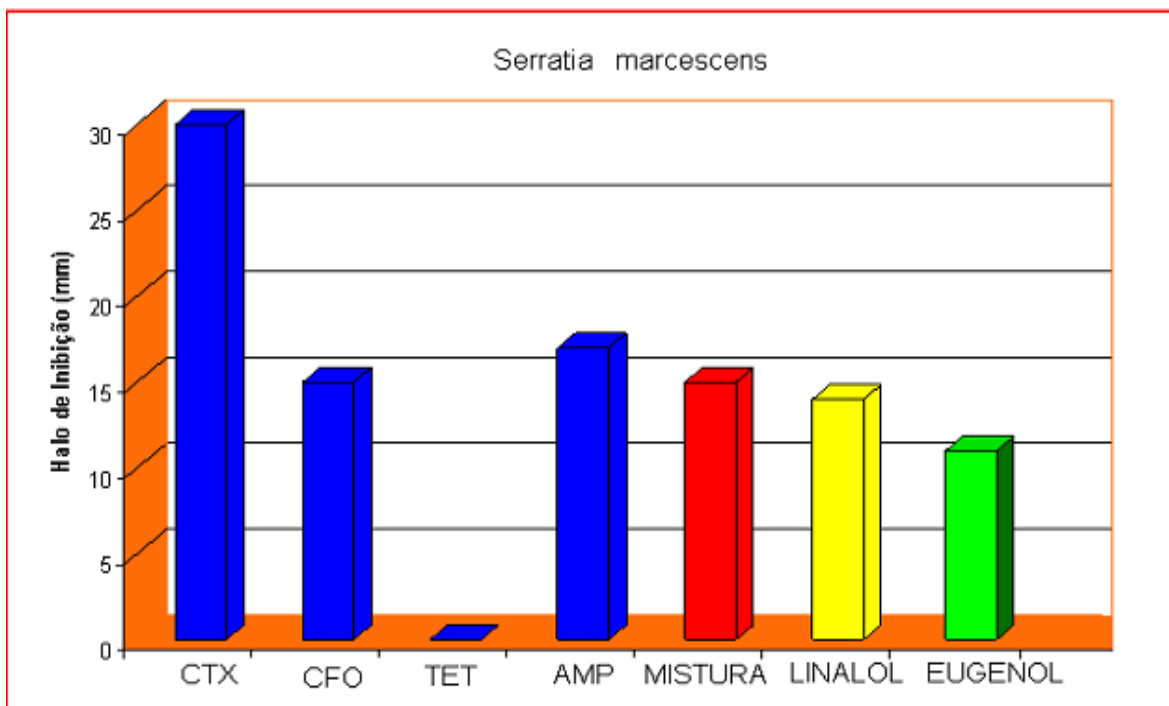


Figura 57 - Gráfico referente aos halos de inibição de crescimento da bactéria *Serratia marcescens*, em mm, causados por alguns antibióticos comerciais, mistura, linalol e eugenol, e determinados pelo método de difusão em discos de Bauer-Kirby

Analisando-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, *et al.*, 2002). Conforme Tabela 4

Tabela 4 - Diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos microrganismos testados pelos antibióticos escolhidos.

Antibióticos	Diâmetro dos halos de inibição (mm)					
	<i>B. cereus</i>	<i>C. violaceum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thyphi</i>	<i>S. marcescens</i>
Ampicilina	22	-	12	0	21	17
Cefotaxima	-	-	-	-	22	30
Cefoxitina	-	-	-	-	17	15
Eritromicina	23	0	-	0	-	-
Gentamicina	-	15	13	-	-	-
Novobiocina	-	-	-	-	0	-
Penicilina	25	-	0	-	-	-
Tetraciclina	27	0	-	0	18	0
Vancomicina	-	0	0	0	-	-

Pode-se observar que a mistura de óleos essenciais apresentou atividade bactericida de excelente nível, para os Microrganismos testados três deles foram considerados moderadamente ativos, pois as bactérias *Salmonella thyphi* (11 mm), *Serratia marcescens* (14 mm) e *Listeria monocytogenes* (13 mm) apresentaram conforme dados nos parênteses os respectivos halos de inibição, muito próximo, portanto, do que o classificaria como muito ativo.

Foi com o *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Chromobacterium violaceum* apresentaram 20 mm de halo de inibição e 14 mm de halo de inibição *Serratia marcescens*, sendo mais eficaz que os padrões de eugenol e linalol, conforme a Tabela 5.

Tabela 5. Halos de inibição de crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphi*, *Serratia marcescens*, causados pela mistura de óleos essenciais e seus padrões, o eugenol e linalol.

Bactérias	Halos de inibição (mm)		
	Mistura	Eugenol	Linalol
<i>Bacillus cereus</i>	20	14	19
<i>Chromobacterium violaceum</i>	20	12	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	13	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	13	13	08
<i>Salmonella thyphi</i>	11	12	11
<i>Serratia marcescens</i>	14	11	13

A diferença entre a ação da mistura de óleos e dos respectivos padrões do linalol e do eugenol pode ser atribuída ao β -mirceno, que é citado na literatura possuindo efeito bactericida, até mesmo, na condição de minoritário. Devem-se considerar também outros fatores que implicam em grande variação da atividade bactericida, 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, *et al.*, 2002).

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, *et al.*, 2003).

Na Tabela 6 para efeito de comparação dos antibióticos testados, mistura de óleos e os padrões, constatou-se, através dos testes microbiológicos que misturar o óleo da *Pimenta dioica* Lindl (pimenta da jamaica) e da *Aniba duckei* Kostermans (pau rosa) é uma forma

inovadora de propiciar um acréscimo considerável nas propriedades antibacterianas dos óleos, sem, no entanto, alterar, de forma significativa, suas propriedades físicas.

Tabela 6 - Atividade antibacteriana dos antibióticos testados, dos padrões de linalol e eugenol e da mistura de óleos.

Atividade Antibacteriana	Diâmetro dos halos de inibição (mm)					
	<i>B. cereus</i>	<i>C. violaceum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thyphi</i>	<i>S. marcescens</i>
Ampicilina	22	-	12	-	21	17
Cefotaxima	-	-	-	-	22	30
Cefoxitina	-	-	-	-	17	15
Eritromicina	23	0	-	0	-	-
Gentamicina	-	15	13	-	-	-
Novobiocina	-	-	-	-	0	-
Penicilina	25	-	0	-	-	-
Tetraciclina	27	0	-	0	18	0
Vancomicina	-	0	0	0	-	-
Eugenol	14	12	13	13	12	11
Linalol	19	16	10	08	11	13
Mistura de óleos	20	20	20	13	11	14

É sabido que o eugenol é mais eficiente que o linalol em termos de atividade antibacteriana, entretanto, ao serem misturadas, estas propriedades tem um ganho considerável a nível microbiológico. Este ganho pode ser atribuído principalmente, a presença do β -mirceno que é citado na literatura mesmo na condição minoritária. Desta forma, essa mistura pode oferecer uma alternativa natural e de baixo custo no combate às doenças causadas pelas bactérias patogênicas estudadas.

Capítulo 6

CONCLUSÃO

Do estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana da mistura dos óleos essenciais de frutos de *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans concluem-se o que se segue.

- Os frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl e os galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans forneceram uma mistura de óleos essenciais com similaridade entre os parâmetros físicos de cada espécie isolados.
- As técnicas espectrométricas de UV-ViS usadas para a caracterização da mistura de óleos apresentaram resultados satisfatórios, quando comparados aos seus padrões, no que diz respeito as suas absorbâncias.
- A identificação positiva do eugenol (28,83%) e o linalol (61,57%) na mistura foram realizados utilizando-se as técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, baseado nos seus tempos de retenção comparados com seus padrões e aos seus fragmentos de massas, nas mesmas condições de análises.
- Através do Método Bauer- Kirby verificou-se que 50% das bactérias testadas foram mais sensíveis a mistura de óleos do que a seus padrões e aos antibióticos comerciais testados. Isso se deve a contribuição dos componentes minoritários, em especial β -mirceno e ao sinergismo existente entre todos os componentes da mistura.
- Foi constatado que a mistura de óleos apresentou uma boa atividade antibacteriana.

Capítulo 7

PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar a atividade antibacteriana da mistura de óleos essenciais dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans em outras proporções, tais como 2:1, 1:2, 3:1, e 1:3.
- Promover a metilação do eugenol e linalol, principais constituintes da mistura de óleos essenciais dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans com o intuito de se obter o metileugenol e metillinalol, testá-los como agentes antibacterianos.
- Desenvolver uma forma farmacêutica, onde da mistura de óleos essenciais dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans possa atuar com princípio ativo de um agente antibacteriano.
- Aplicar a mistura de óleos essenciais dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans para desenvolver vários produtos de limpeza ou em cosméticos.
- Testar a toxidez dos óleos essenciais isolados e misturados.

Capítulo 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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. **International Journal of Food Microbiology**, n.80, p.223-230, 2003.

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

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

Atraso. Disponível em:<http://www.globorural.globo.com/edic/185/rep_tradicao9.html> Acesso em: 12 jul. 2002.

ASTA **on line**. **All spice**. Disponível em: <<http://www.astaspice.org/index.cfm>> Acesso em: 17 mar. 2004.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v.I. São Paulo: EDUSP,1978. 255p.

BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. Philadelphia, v.45, p.493-496, 1966.

BEZERRA, J.A. Perfume que vem da mata. Disponível em: <http://www.globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/185/rep_tradicao.htm> Acesso em 1º maio 2004.

BRITANIA. NUEVA DISTRIBUCIÓN DE DISCOGRAMAS BRITANIA. Disponível em: <http://www.britanialab.com/espanol/k07_01.html> Acesso em: 30 de maio de 2008.

BIOSAPIENS. Pau rosa - **Aniba roseodora Ducke**. Disponível em: <http://www.biosapiens.com.br/index_0312.php> Acesso em 22 fev. 2004.

CAMPOS, Janaína Abrantes. **Estudos analíticos do óleo essencial extraído da espécie *Aniba duckei* Kostermans e sua aplicação em perfume**. São Luís. 2003, 68f. Monografia (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.

CDC, Centers for Disease Control and Prevent. **Division of vector-borne infections diseases**. Dengue fever. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>>. Acessado em: 10 abr. 2009.

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. **Journal of Ethno-pharmacology**, v.79, 2002. p. 213-220.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 10. ed, v. 29, n. 1, Jan, 2009.

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

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

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L. SANTOS, N. K. A.; CARDOS, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Rev. **Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti***. Rev. Bras. Farmacognosia, 15(4): 304, 2005.

CHAAR, Jamal da Silva. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. São Carlos, 2000. 150p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos/SP, 2000.

Cloranfenicol. Disponível em: <<http://www.meusite.pro.br/dogasproibb -bc.htm>> Acesso em: 1 jun. 2007.

CRONQUIST, A. **The Evolution and classification of flowering plants**. 2ed. New York: New York Botanical Garden, 1988. 517p.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978. 4.v.

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

DEMO, M; OLIVIVA, 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

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

DIGHE, A. et al. **Antimicrobial Susceptibility Testing.** *Clinical Laboratory Reviews*, n.9. p. 01-04, 2001.

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

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

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

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

ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F. A.; GOLDEN, D. A.; MOUNT, J. R. Antimicrobial activity of essential oil from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganism. ***Journal of Food Protection***, 2001, v.64, p.1019-1024.

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

FAJARDO, G. et al. Comparative study of the oil and supercritical CO₂ extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merrill). ***J. Essent. Oil Res.***, v.9. n.2, p. 181-185, 1997.

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

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

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

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

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

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

ITO, M; MURAKAMI, K; YOSHHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**, 2005, v. 43, n. 3, p. 461-466.

KALIL FILHO, A.N. **Conservação de gimnospermas de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano**. Manaus: EMBRAPA, Comunicado Técnico, n.50, 2000.

KATZER, G. Allspice (*Pimenta dioica* [L.] Mer.). Disponível em: <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/eugl/pime-dio.html> Acesso em: 17 mar. 2004.

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

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

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Laurácea Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1,p.195-206, jan./dez 2001.

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.

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

MINOTT, D. A.; BROWN, H. A. Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dioica* (L.) Merr. Trees Based on Composition of Leaf Volatiles. *J. of Essential Oil Research: JEOR*, Jul 2007. Disponível em:<http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_/ai_n19434097>. Acessado em: 04 outubro 2008.

MONTEIRO, Odair dos Santos. **Caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas *Euglossina***. João Pessoa, 2008. 126 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Universidade Federal da Paraíba- UFPB. 2008.

MONTEIRO, Odair Santos. **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.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil.** *Quím. Nova*, 29(5): 907, 2006.

MOUCHREK FILHO, V. E. **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. 2000, 124p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, USP.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Introdução à Química de Óleos Essenciais.** São Luís, 2001. 72p. Apostila.

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

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

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

OMS, Organização Mundial de saúde. **OMS apóia estudo com plantas medicinais.** Disponível em: <http://www.drashi/fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.ht> Acesso em: 17 jul. 2002.

PARRY, J.W. **Spices.** New York: Chemical, 1969. v. I. p.163 - 165.

PARRY, J.W. **Spices.** New York: Chemical, 1969. v. II. p.7-11.

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.

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

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops.** Dicotyledons. Longman, 1960. p. 408-414.

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

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

SANTOS, Leila Márcia. **Caracterização e avaliação da atividade bactericida do óleo essencial e do óleo acetilado da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. São Luís, 2004. 100fl. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004.

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 medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/Ed. da UFSC, 1999. p. 291-320.

SEME YOUSSEF REDA E PAULO BORBA CARNEIRO, 2007 **ÓLEOS E GORDURAS: Aplicações e Implicações**

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S.A., 2006.

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

SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

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

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.

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.

SUDAM (1972) O extrativismo do Pau-rosa, SUDAM Documentos Amazônicos, 5-55
SYDOW, E. Mass spectrometry of terpenes II. Monoterpene alcohols. **Acta Chemical Scandinavica**. v.17, p.2504-12, 1963.

TAVARES, W.; **Manual de antibióticos e quimioterápicos**, 2ª. edição. Ed. Ateneu, São Paulo, 2001.

TAVARES, W.; MAGALHÃES, G. A. P. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. São Paulo: Ateneu, 2007.

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

TELES, R.M. **Caracterização química e estudo larvicida dos óleos de *Aniba duckei* Kostermans contra *Aedes aegypti***. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de Doutorado, 110p.

TELES, Rogério de Mesquita. **Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galho da espécie *Aniba duckei* kostermans e sua aplicação como agente bactericida**. São Luís. 2003, 99f. Dissertação(mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.

The epicentre. All spice. Disponível em:

<<http://www.theepicentre.com/spices/allspices.htm>> Acesso em: 18 abr. 2004.

TRABUSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 718p., 2004.
TRABULSI, R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, Y. A. N. **Microbiologia**, 3ª edição. Ed. Atheneu, São Paulo, 1999.

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

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.

WERFF, H. et al. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of Missouri Botanical garden**. V. 8, p. 419 – 432, 1996.

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

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

WITCHELL, J. K., CARTER, W. E. Modeling Antimicrobial Activity of Clorox™ Using an Agar-Diffusion Test: A New Twist on an Old Experiment. **Bioscene**. v.26, n.3, Aug. 2000.