



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas

Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica

Gustavo Marcelo da Luz Nascimento

Extração e avaliação farmacológica de óleos essenciais de pimenta para fins tecnológicos.

**Uberaba
2015**

Gustavo Marcelo da Luz Nascimento

Extração e Avaliação Farmacológica de óleos essenciais de pimenta para fins tecnológicos.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito final para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass

Coorientador: Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass

Uberaba
2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

N195e Nascimento, Gustavo Marcelo da Luz
Extração e avaliação farmacológica de óleos essenciais de pimenta
para fins tecnológicos / Gustavo Marcelo da Luz Nascimento. -- 2015.
100 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) --
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientadora: Profª Drª Ana Cláudia Granato Malpass
Coorientador: Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass

1. Pimenta. 2. Óleos essenciais. 3. Cromatografia gasosa. I.
Malpass, Ana Cláudia Granato. II. Universidade Federal do Triângulo
Mineiro. III. Título.

CDU 582.672

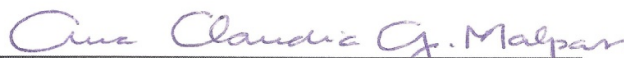
GUSTAVO MARCELO DA LUZ NASCIMENTO

EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
DE PIMENTA PARA FINS TECNOLÓGICOS

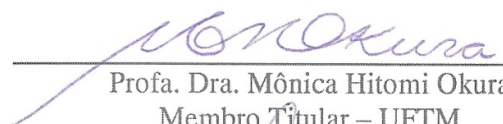
Trabalho de conclusão apresentado ao
Programa de Mestrado Profissional em
Inovação Tecnológica da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como requisito
para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 27 de agosto de 2015

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass
Orientadora – PMPIT - UFTM



Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura
Membro Titular – UFTM



Prof. Dr. Odair Francisco
Membro titular – FIO

Aos meus Familiares, Professores e Companheiros de mestrado, de uma forma geral, dedico-lhes este trabalho como forma de reconhecimento ao carinho, paciência e compreensão, por mostrarem a importância e alegria de cada novo passo norteado com confiança e amor. A todos aqueles que de boa vontade contribuíram para que o conhecimento esteja ao alcance de todos.

“Pimentas são frutinhas coloridas que têm poder para provocar incêndios na boca. Pois há ideias que se assemelham às pimentas: elas podem provocar incêndios nos pensamentos. Mas, para se provocar um incêndio não é preciso fogo. Basta uma única brasa. Um único pensamento pimenta...”

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a DEUS e a meus pais, GRACY e ARACANÃ, pela minha existência e por serem o alicerce onde erigi minha vida;

À minha esposa MARIANE e à minha filha ALICE, pois além de serem as pimentas que temperam minha vida, sempre estão comigo nos momentos felizes e me apoiam durante os momentos difíceis;

À minha irmã GRACIARA, ao meu cunhado FELIPE, meus sobrinhos JOSÉ GABRIEL e GIULIA, meus sogros MÁRIO e REGINA, a todos meus amigos e familiares, pelo incentivo ao longo desta jornada;

Às colegas CAROLINA DOS SANTOS BRAGINE FERREIRA, JESSICA MIRANDA ROSA, LAIRA MARINELLI e SABRINA MIQUELETTI DOS SANTOS, pelas contribuições durante a realização dos experimentos deste trabalho;

Aos funcionários desta Instituição e em especial ao MATEUS SILVEIRA FREITAS, que contribuíram e apoiaram para a realização deste trabalho;

À empresa Ourofino Agrociência pela realização das análises de CG-EM;

À professora e orientadora, Prof^a. Dr^a. ANA CLAUDIA GRANATO MALPASS, e ao professor e co-orientador, Prof. Dr. GEOFFROY ROGER POINTER MALPASS que me auxiliaram com atenção, disposição e empenho necessários para o desenvolvimento ideal deste trabalho.

RESUMO

Com uma grande variedade de espécies em diversos gêneros botânicos, as pimentas e sua importância permeiam a humanidade, seja na gastronomia, História, paisagismo, cosmetologia, farmacologia e medicina. O objetivo principal deste trabalho consistiu em analisar exemplares de variedades de pimentas secas e *in natura*, comumente utilizadas na região do Triângulo Mineiro para obtenção de seus respectivos óleos essenciais/oleoresinas por meio de dois métodos de extração: Soxhlet e Clevenger. As pimentas estudadas foram: pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*), pimenta-do-reino-branca (*Piper nigrum*), pimenta-do-reino-preta (*Piper nigrum*), pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*), pimenta-dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*), pimenta-biquinho (*Capsicum chinense*), pimenta-bode (*Capsicum chinense*) e pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens*). Posteriormente, foram realizados bioensaios para verificação de atividades antifúngicas contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Penicillium* sp., assim como para atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os óleos essenciais/oleoresinas com melhores resultados nos bioensaios foram quimicamente analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Tendo em vista a atividade antimicrobiana, dentre as oleoresinas obtidas por Soxhlet, todas as amostras extraídas foram ativas contra *B. cereus*, já contra *E. coli* e *S. aureus*, somente os de *P. dioica*, *P. nigrum* (b), *P. nigrum* (p) e *S. terebinthifolius*. Dentre os óleos essenciais obtidos por Clevenger, somente as amostras de *P. dioica*, *P. nigrum* (b), *P. nigrum* (p) e *S. terebinthifolius* apresentaram atividades. Em relação à atividade antifúngica, os óleos essenciais/oleoresinas de *P. nigrum* (b), *P. nigrum* (p), *C. chinense* (b), *C. chinense* (bq), *C. baccatum* e *C. frutescens* não apresentaram inibição. Os óleos essenciais/oleoresinas de *P. dioica* apresentaram atividades contra todos os microrganismos e os óleos essenciais/oleoresinas de *S. terebinthifolius*, não apresentaram atividade somente contra *A. niger*. Isto posto, a aplicabilidade biotecnológica dos óleos essenciais/oleoresinas bioativos mostra-se interessante, com grande importância na área farmacológica.

Palavras-chave: Pimenta. Óleos Essenciais. Cromatografia Gasosa.

ABSTRACT

With a wide variety of species in several botanical genera, peppers and their importance permeate humanity, whether in gastronomy, history, landscape, cosmetology, pharmacology and medicine. The main objective of this study was to analyze samples of dried and fresh pepper varieties, commonly used in the Triângulo Mineiro region, to obtain their respective essential oils by two extraction methods, namely Soxhlet and Clevenger. The peppers studied were: pimenta-do-reino-branca (*Piper nigrum*), pimenta-do-reino-preta (*Piper nigrum*), pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*), pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*), pimenta-dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*), pimenta-bode (*Capsicum chinense*), pimenta-biquinho (*Capsicum chinense*) and pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens*). Subsequently, experiments were conducted to check antifungal activity against *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Penicillium* sp., as well as antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Essential oils/oleoresins with better results in bioassays were chemically analyzed by Gas Chromatography Mass Spectrometry. Considering the antimicrobial activity, among oleoresins obtained by Soxhlet extracted samples all were active against *B. cereus*, against *E. coli* and *S. aureus*, only *P. dioica*, *P. nigrum* (b) *P. nigrum* (p) and *S. terebinthifolius*. Among the essential oils obtained by Clevenger, only samples of *P. dioica*, *P. nigrum* (b), *P. nigrum* (p) and *S. terebinthifolius* presented activities. With respect to antifungal activity, the essential oils/oleoresins *P. nigrum* (b), *P. nigrum* (p), *C. chinense* (b), *C. chinense* (bq), *C. baccatum* and *C. frutescens* showed no inhibition. Essential oils/oleoresins of *P. dioica* showed activity against all microorganisms and essential oils/oleoresins of *S. terebinthifolius* did not show activity only against *A. niger*. That said, the biotechnological applicability of bioactive essential oils/oleoresins proves to be interesting, with great importance in the pharmaceutical area.

Keywords: Pepper. Essential Oils. Gas Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas metabólicas.....	20
Figura 2 – Estrutura química das moléculas de piperina e de capsaicina.....	22
Figura 3 – Corte longitudinal de um fruto de pimenta-dedo-de-moça.....	22
Figura 4 – Fotos das pimentas em grãos estudadas.....	25
Figura 5 – Fotos das pimentas <i>in natura</i> estudadas.....	26
Figura 6 – Cultivo de pimenta-do-reino durante a época das Grandes Navegações.....	29
Figura 7 – Carregamento de pimenta-do-reino no porto de Calcutá, no século XVI.....	30
Figura 8 – Biogeografia das pimentas pelo mundo.....	30
Figura 9 – Pimenta-da-Jamaica com grãos imaturos.....	31
Figura 10 – Pimenta-do-reino com grãos imaturos.....	32
Figura 11 – Variedade de condimentos preparados com frutos de pimenta-do-reino.....	33
Figura 12 – Processamento das variedades de pimenta-do-reino.....	34
Figura 13 – Espécime de aroeira-vermelha (<i>Schinus terebinthifolius</i>).....	36
Figura 14 – Vaso ornamental de pimenta-dedo-de-moça.....	37
Figura 15 – Planta de pimenta-biquinho.....	38
Figura 16 – Planta de pimenta-bode.....	39
Figura 17 – Planta de pimenta-malagueta.....	40
Figura 18 – Esquematização de um processo de destilação por arraste a vapor.....	41
Figura 19 – Esquematização de um processo de hidrodestilação.....	42
Figura 20 – Esquema da vidraria utilizada para o método Clevenger.....	42
Figura 21 – Digestão de amostras por radiação micro-ondas.....	43
Figura 22 – Almofariz e pistilo com pimentas em grãos.....	44
Figura 23 – Esquematização de um extrator Soxhlet.....	45
Figura 24 – Diagrama de fases para CO ₂ em estado supercrítico.....	46
Figura 25 – Bactérias utilizadas nos bioensaios.....	47
Figura 26 – Fungos utilizados nos bioensaios.....	48
Figura 27 – Representação da Escala de Scoville.....	53

Figura 28 – As quatro pimentas mais ardidas do mundo, segundo o Guinness World Records 2015.....	54
Figura 29 – Cromatogramas e Espectro de Massas da análise do óleo essencial de pimenta-rosa (<i>S. terebinthifolius</i>) por CG-EM.....	66
Figura 30 – Espectro de Massas do pico em 7,12 min (1.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto α -pineno, realizada por comparação com o NIST.....	67
Figura 31 – Espectro de Massas do pico em 8,48 min (2.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto α -felandreno, realizada por comparação com o NIST.....	68
Figura 32 – Espectro de Massas do pico em 8,66 min (3.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto β -pineno, realizada por comparação com o NIST.....	69
Figura 33 – Espectro de Massas do pico em 9,09 min (4.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto β -mirceno, realizada por comparação com o NIST.....	70
Figura 34 – Espectro de Massas do pico em 9,74 min (5.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto trans-3-carenen-2-ol, realizada por comparação com o NIST.....	71
Figura 35 – Espectro de Massas do pico em 9,83 min (6.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto 1-R- α -pireno, realizada por comparação com o NIST.....	72
Figura 36 – Espectro de Massas do pico em 10,46 min (7.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto o-cimeno, realizada por comparação com o NIST.....	73
Figura 37 – Espectro de Massas do pico em 10,66 min (8.º pico) obtido no	

cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto (-)-limoneno, realizada por comparação com o NIST.....	74
Figura 38 – Cromatogramas e Espectro de Massas da análise do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (<i>P. dioica</i>) por CG-EM.....	76
Figura 39 – Espectro de Massas do pico em 9,09 min (1.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto β -mirceno, realizada por comparação com o NIST.....	78
Figura 40 – Espectro de Massas do pico em 9,74 min (2.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto α -felandreno, realizada por comparação com o NIST.....	79
Figura 41 – Espectro de Massas do pico em 10,46 min (3.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto 1-pentanona, realizada por comparação com o NIST.....	80
Figura 42 – Espectro de Massas do pico em 10,65 min (4.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto (-)-limoneno, realizada por comparação com o NIST.....	81
Figura 43 – Espectro de Massas do pico em 13,67 min (5.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto β -pineno, realizada por comparação com o NIST.....	82
Figura 44 – Espectro de Massas do pico em 17,24 min (6.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto γ -terpineno, realizada por comparação com o NIST.....	83
Figura 45 – Espectro de Massas do pico em 24,89 min (7.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto p-eugenol, realizada por comparação com o NIST.....	84

Figura 46 – Espectro de Massas do pico em 24,89 min (8.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto biciclo [7,2,0]-undec-4-eno-4,11,11-trimetil-8-metileno, realizada por comparação com o NIST.....	85
Figura 47 – Valores preditos x Valores observados.....	88
Figura 48 – Efeito da variável “método de extração”.....	89
Figura 49 – Efeito da variável “tipo de pimenta”.....	90
Figura 50 – Efeito da Interação entre as variáveis: Tipo de Método*Tipo de Pimenta.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados sobre a extração de óleos essenciais/oleoresinas das pimentas estudadas.....	59
Tabela 2 – Dados dos bioensaios de atividade antibacteriana dos óleos essenciais/oleoresinas extraídos das pimentas estudadas.....	60
Tabela 3 – Dados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos essenciais/oleoresinas para os fungos estudados.....	62
Tabela 4 – Dados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos essenciais/oleoresinas para as bactérias estudadas.....	63
Tabela 5 – Compostos identificados em óleo essencial de pimenta-rosa (<i>S. terebinthifolius</i>), por CG-EM.....	65
Tabela 6 – Compostos identificados em óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (<i>P. dioica</i>), por CG-EM.....	77
Tabela 7 – Quadro de ANOVA (<i>two way</i>).....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. niger</i>	- <i>Aspergillus niger</i>
<i>B. cereus</i>	- <i>Bacillus cereus</i>
<i>C. albicans</i>	- <i>Candida albicans</i>
<i>C. baccatum</i>	- <i>Capsicum baccatum</i>
<i>C. chinense</i> (bq)	- <i>Capsicum chinense</i> (biquinho)
<i>C. chinense</i> (b)	- <i>Capsicum chinense</i> (bode)
<i>C. frutescens</i>	- <i>Capsicum frutescens</i>
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
<i>P. sp.</i>	- <i>Penicillium sp.</i>
<i>P. dioica</i>	- <i>Pimenta dioica</i>
<i>P. nigrum</i> (b)	- <i>Piper nigrum</i> (branca)
<i>P. nigrum</i> (p)	- <i>Piper nigrum</i> (preta)
<i>S. aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. terebinthifolius</i>	- <i>Schinus terebinthifolius</i>

LISTA DE SIGLAS

BHI	- Brain heart infusion
CG	- Cromatografia gasosa
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas
CMI	- Concentração mínima inibitória
CO ₂	- Dióxido de Carbono
CTIs	- Centros de Tratamentos e Terapias Intensivas
EM	- Espectrometria de massas
IE	- Impacto de elétrons
IQ	- Ionização química
MG	- Minas Gerais
NCCLS	- National Committee for Clinical Laboratory Standards
NIST	- National Institute of Standards and Technology
PB(C)	- Óleo essencial de pimenta-bode extraído por Clevenger
PB(S)	- Óleo essencial de pimenta-bode extraído por Soxhlet
PBQ(C)	- Óleo essencial de pimenta-biquinho extraído por Clevenger
PBQ(S)	- Óleo essencial de pimenta-biquinho extraído por Soxhlet
PDJ(C)	- Óleo essencial de pimenta-da-Jamaica extraído por Clevenger
PDJ(S)	- Óleo essencial de pimenta-da-Jamaica extraído por Soxhlet
PDM(C)	- Óleo essencial de pimenta-dedo-de-moça extraído por Clevenger
PDM(S)	- Óleo essencial de pimenta-dedo-de-moça extraído por Soxhlet
PM(C)	- Óleo essencial de pimenta-malagueta extraído por Clevenger
PM(S)	- Óleo essencial de pimenta-malagueta extraído por Soxhlet
PMPIT	- Programa de Mestrado Profissional em Inovações Tecnológicas
PR(C)	- Óleo essencial de pimenta-rosa extraído por Clevenger
PR(S)	- Óleo essencial de pimenta-rosa extraído por Soxhlet
PRB(C)	- Óleo essencial de pimenta-do-reino-branca extraído por Clevenger
PRB(S)	- Óleo essencial de pimenta-do-reino-branca extraído por Soxhlet
PRP(C)	- Óleo essencial de pimenta-do-reino-preta extraído por Clevenger
PRP(S)	- Óleo essencial de pimenta-do-reino-preta extraído por Soxhlet
UFTM	- Universidade Federal do Triângulo Mineiro

LISTA DE SÍMBOLOS

®	-	Marca registrada
%	-	Porcentagem
µl	-	Microlitros
µm	-	Micrômetro
°C	-	Graus Celsius
cm	-	Centímetros
eV	-	Eletronvolt
g	-	Grama
K	-	Graus Kelvin
min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
m	-	Metro
™	-	Trademark

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVOS GERAIS	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3.1 AS PIMENTAS E A HUMANIDADE	28
3.2 AS ESPÉCIES ESTUDADAS	31
3.2.1 Pimenta-da-Jamaica (<i>Pimenta dioica</i>)	31
3.2.2 Pimenta-do-reino (<i>Piper nigrum</i>)	32
3.2.3 Pimenta-rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i>)	35
3.2.4 Pimenta-dedo-de-moça (<i>Capsicum baccatum</i>)	36
3.2.5 Pimenta-biquinho (<i>Capsicum chinense</i>)	37
3.2.6 Pimenta-bode (<i>Capsicum chinense</i>)	38
3.2.7 Pimenta-malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>)	39
3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	40
3.3.1 Destilação por arraste a vapor	41
3.3.2 Hidrodestilação	41
3.3.3 Micro-ondas	43
3.3.4 Digestão de amostras (extração por solventes)	43
3.3.5 Soxhlet	44
3.3.6 Ultrassom	45
3.3.7 Extração com fluido supercrítico	46
3.4 MICRORGANISMOS ESTUDADOS	47
3.4.1 As Bactérias estudadas	48
3.4.1.1 <i>Bacillus cereus</i>	48
3.4.1.2 <i>Escherichia coli</i>	49
3.4.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	49
3.4.2 Os fungos estudados	50
3.4.2.1 <i>Aspergillus niger</i>	50
3.4.2.2 <i>Candida albicans</i>	50
3.4.2.3 <i>Penicillium sp.</i>	51

3.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA GASOSA (CG).....	52
3.6 CURIOSIDADES SOBRE PIMENTAS.....	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1 EXTRAÇÕES.....	55
4.2 BIOENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA.....	55
4.2.1 Difusão em disco de papel.....	56
4.2.2 Microdiluição em caldo.....	56
4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	56
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
5.1 EXTRAÇÕES.....	58
5.2 BIOENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA.....	59
5.3 ANÁLISES POR CG-EM.....	64
5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS.....	86
6 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, os Seres Humanos vêm utilizando os vegetais em sua alimentação. Por meio de experimentação, verificou-se que alguns vegetais, além de saciarem sua fome, também possuíam efeitos benéficos para a saúde. Seja como auxiliar ao combate de infecções, curativos, revigorantes, entre outros, a humanidade sempre lançou mão da utilização de plantas medicinais (ALICE et al., 1995; ROCHA; ROCHA, 2006).

Para Correa, Batista e Quintas (2011), a civilização pôde através da observação e estudo, concluir que as propriedades farmacológicas poderiam advir de diversos lugares dos vegetais, dentre os quais se destacam os óleos essenciais.

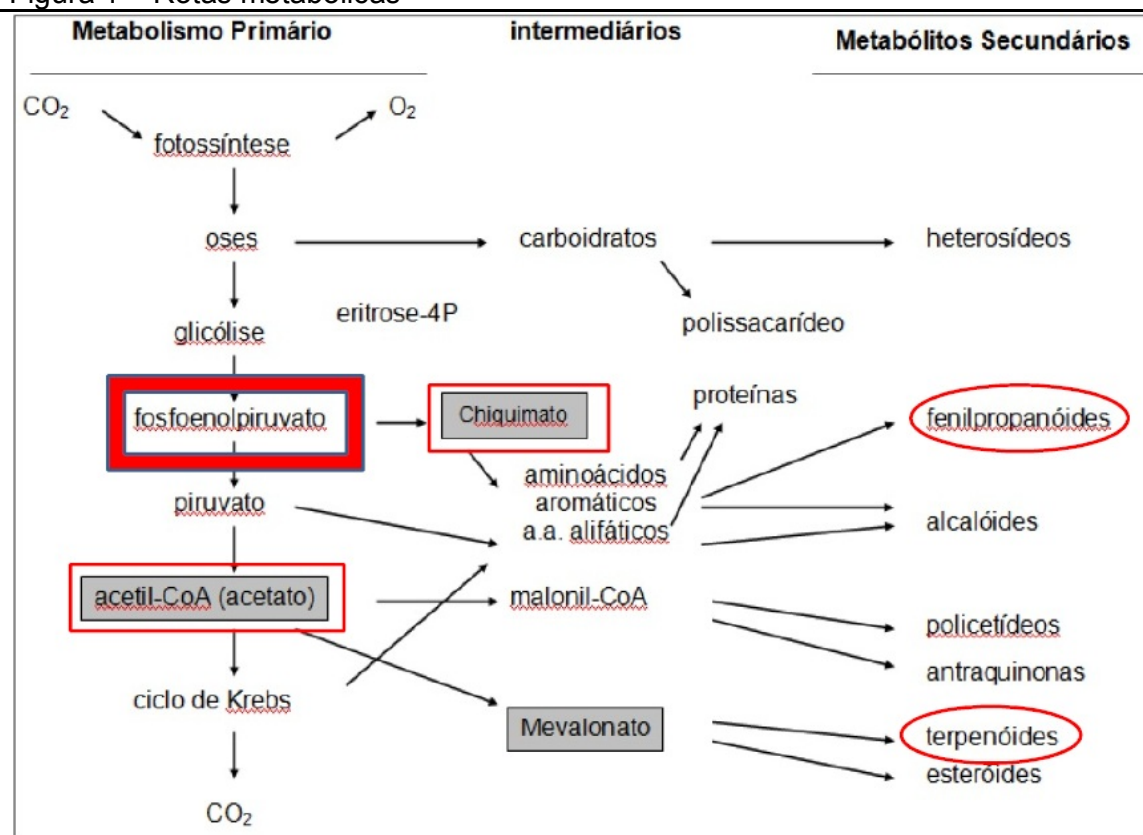
Os óleos essenciais são metabólitos secundários das plantas, podendo estar presentes em diversas estruturas morfológicas (folha, flor, fruto, semente, resina, caule, glândulas, ductos, pelos, tricomas, canais secretores e bolsas secretoras, etc.), dependendo do espécime estudado (BURNIE, 1997).

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certa direção na produção dos compostos formados, sendo denominadas rotas metabólicas ou rotas biossintéticas. Os compostos formados são denominados de metabólitos (CARVALHO, 2002).

Momesso (2010) explicita que partindo de um composto do metabolismo primário denominado fosfoenolpiruvato, pode se originar através da via do chiquimato, os fenilpropanóides (metabolismo secundário) e através da via do acetato, os terpenóides (metabolismo secundário) (Figura 1).

Consequente, os óleos essenciais caracterizam-se por serem compostos voláteis complexos e por possuírem odor e sabor, o que atribui características específicas a diversos vegetais. Dessa forma, podem ser de grande valor para indústrias de alimentos, fármacos, defensivos agrícolas, entre outras (McMURRY, 2011).

Figura 1 – Rotas metabólicas



Fonte: Momesso, 2010

Derivados do metabolismo primário e metabolismo intermediário, os fenilpropanóides e terpenóides originam-se por meio das rotas metabólicas secundárias.

Segundo Silva e Bastos (2007), os óleos essenciais podem apresentar diferentes composições de acordo com as condições climáticas, estresse, estágio de desenvolvimento e localização na planta. Os óleos essenciais são em sua maioria, hidrocarbonetos, alcoóis e éteres voláteis, formados quimicamente por misturas complexas de substâncias terpênicas (COSTA; DIAS; GUIMARÃES, 2004).

Os constituintes principais dessas misturas são os monoterpenos. Essas substâncias apresentam geralmente odores agradáveis e interessantes propriedades biológicas. São insolúveis em água e podem ser extraídos das plantas por diversos métodos, dentre os quais se destaca a hidrodestilação e a extração por solventes (McMURRY, 2011).

Segundo Gomes e Oliveira (2001), para então evidenciar a presença ou não de óleos essenciais, torna-se necessária a extração natural destes, seguida de sua separação e posteriormente, uma identificação por meio de processos químicos.

Corroborando para tal afirmação, em Collins, Braga e Bonato (1997) é relatado que para extração de óleos essenciais pode-se utilizar diversas técnicas, desde as mais simples, como cromatografia em coluna ou camada fina, até as mais sofisticadas, como a espectrometria de massas, que exigem aparelhagem complexa.

Em Reifschneider (2000) é descrito que as pimentas são largamente utilizadas em diversas culturas e desta forma, são denominados os frutos e condimentos que quando ingeridos provocam sensação de ardência e pungência. Não existe uma única classe botânica para classificá-las, já que em diversas famílias ocorrem o aparecimento dessas características. Comumente, são denominadas pimentas as sementes de alguns espécimes da Família *Piperaceae*, os frutos da Família *Solanaceae* do gênero *Capsicum*, os frutos de algumas espécies da Família *Myrtaceae* e da Família *Anacardiaceae*. Neste trabalho, serão utilizadas variedades das Famílias *Piperaceae*, *Solanaceae* e *Myrtaceae*.

Com aproximadamente 3.000 espécies, a Família *Piperaceae* atualmente é distribuída em oito gêneros. Ocorrem no Brasil cerca de 470 espécies, dentre estas as mais comuns são aquelas as quais foram introduzidas ainda na época da colonização. A Família apresenta espécies importantes como fontes de substâncias com atividades farmacológicas, especialmente do gênero *Piper*, o mais estudado e conhecido do ponto de vista químico. Tal Família compreende as variedades de pimentas-do-reino (REIFSCHNEIDER, 2000).

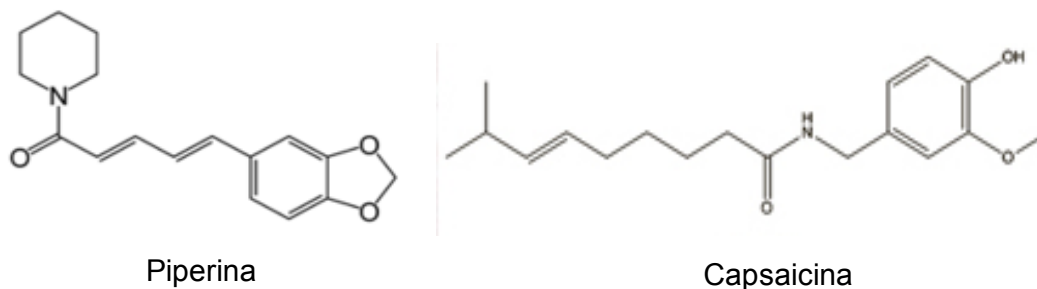
Em Di Stasi et al. (2002), é descrito que a Família *Solanaceae* possui cerca de 3.000 espécies divididas em 10 gêneros e sendo o gênero *Solanum* apresenta-se com o maior número de espécies e envolve quase a metade do total das espécies. Facilmente encontrados na América do Sul por sua alta adaptabilidade ao ambiente tropical ou andino. De grande importância econômica, por abranger cultivares alimentar (batatas, tomates, pimentas, berinjelas, pepinos, tabaco, dentre outros).

Já em Ferreira (1998), é descrito que a Família *Myrtaceae* está dividida em aproximadamente 130 gêneros, com aproximadamente 3500 espécies, de porte arbustivo a árvores de grande porte. Muitas são frutíferas (jambo, jabuticaba, goiaba, pitanga, etc.) e de grande interesse econômico (eucaliptos e melaleucas).

Na última década, esta família esteve em grande destaque devido à possibilidade de sua utilização, principalmente das variedades de eucaliptos, para obtenção de créditos de carbono de acordo com o Protocolo de Kyoto (NASCIMENTO et al., 2011).

Dentre os diversos metabólitos obtidos nas pimentas em geral, dois destacam-se: a piperina e os capsaicinóides (Figura 2). Dentre as propriedades farmacológicas da capsaicina destaca-se a ação mucolítica, termogênica e analgésica. Atua sobre a fisiopatologia da dor, principalmente nos mediadores químicos que induzem analgesia (PEREIRA et al., 2015; GRÉGIO et al., 2008).

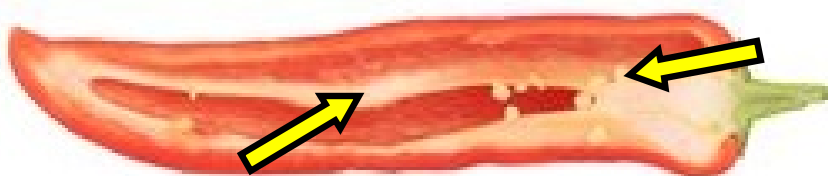
Figura 2 – Estrutura química das moléculas de piperina e de capsaicina



Fonte: Do Autor, 2015

Em Pereira et al. (2015), é descrito que os capsaicinóides são encontrados em grande abundância nas pimentas vermelhas, nas nervuras e sementes de seus frutos (Figura 3). Já a piperina é encontrada principalmente nos frutos e sementes de pimentas-do-reino.

Figura 3 – Corte longitudinal de um fruto de pimenta-dedo-de-moça



Fonte: Ruka's Pepper, 2014
Em destaque, nervuras e sementes ricas em capsaicinóides.

Agem como vasodilatadores locais, pois aumentam o fluxo sanguíneo, de nutrientes e de oxigênio e desta forma elevam as atividades anti-inflamatórias e imunológicas. Estimulam também as papilas gustativas e as ramificações nervosas, portanto causam grande pungência. Além desses efeitos, os frutos de pimentas são muito ricos fibras, em vitaminas A, E, C, ácido fólico, zinco e potássio (REIFSCHNEIDER, 2000).

Assim, o presente estudo apresenta uma revisão bibliografia referente à utilização dos diversos tipos de pimentas através da História, com ênfase nas variedades utilizadas neste trabalho, além de contextualizar sobre óleos essenciais/oleoresinas e seus diversos métodos de extração. Ademais, por meio da revisão bibliográfica, explicita-se os microrganismos utilizados nos bioensaios, para em seguida, detalhar a metodologia de trabalho, com posterior apresentação e discussão dos resultados obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo realizar a extração dos óleos essenciais/oleoresinas de oito tipos de pimentas *in natura* e em grãos obtidos pelos métodos Soxhlet e Clevenger, assim como avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica desses óleos.

Tendo em vista a escassez de estudos referentes às atividades dos óleos essenciais/oleoresinas de pimentas e suas aplicabilidades biotecnológicas, bem como verificar seu potencial farmacológico, este trabalho configura-se como uma importante ferramenta para futuros processos industriais.

Neste estudo, a classificação para o estudo das variedades foi realizada por duas formas de apresentação: em grãos e *in natura*, e com base na ordem alfabética, os nomes científicos das variedades (THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX, 2005).

Variedades de pimentas em grãos (Figura 4):

- Pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica* L. Merr., 1947 - Myrtales: *Myrtaceae*);
- Pimenta-do-reino-branca (*Piper nigrum* L., 1753 – Piperales: *Piperaceae*);
- Pimenta-do-reino-preta (*Piper nigrum* L., 1753 – Piperales: *Piperaceae*);
- Pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi, 1820 - Sapindales: *Anacardiaceae*).

Variedades de pimentas *in natura* (Figura 5):

- Pimenta-dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* L., 1831 – Solanales: *Solanaceae*);
- Pimenta-biquinho (*Capsicum chinense* Jacq., 1776 – Solanales: *Solanaceae*);
- Pimenta-bode (*Capsicum chinense* Jacq., 1776 – Solanales: *Solanaceae*);
- Pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens* L., 1753 – Solanales: *Solanaceae*).

Figura 4 – Fotos das pimentas em grãos estudadas

Grãos de pimenta-da-Jamaica, já preparados como condimento



Fonte: Kress, 2006

Grãos de pimenta-do-reino-branca, já preparados como condimento



Fonte: Knapp, 2012

Grãos de pimenta-do-reino-preta, já preparados como condimento



Fonte: Knapp, 2012

Frutos de pimenta-rosa



Fonte: Starr e Starr, 2004

Figura 5 – Fotos das pimentas *in natura* estudadas

Frutos de pimenta-dedo-de-moça



Frutos de pimenta-biquinho



Frutos de pimenta-bode



Frutos de pimenta-malagueta



Fonte: Knapp, 2012

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Realizar a extração dos óleos essenciais de pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*), pimenta-do-reino-branca (*Piper nigrum*), pimenta-do-reino-preta (*Piper nigrum*), pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*), pimenta-dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*), pimenta-biquinho (*Capsicum chinense*), pimenta-bode (*Capsicum chinense*) e pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens*), pelos métodos de Soxhlet e Clevenger;
- Comparar a eficiência, rendimento e qualidade das oleoresinas e óleos essenciais obtidos através dos dois métodos de extração utilizados;

- Verificar qual (is) pimenta (s) apresenta (m) melhor (es) eficiência de extração de óleos essenciais;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica dos óleos essenciais extraídos frente aos microrganismos abaixo citados, tendo como base sua taxonomia e a ordem alfabética de seus nomes científicos (KIRK, 201-?; EUZÉBY, 1997):

Reino Monera

Bactéria Gram-negativa:

- *Escherichia coli* T. Escherich, 1885 (Enterobacterales: *Enterobacteriaceae*);

Bactérias Gram-positivas:

- *Bacillus cereus* Frankland and Frankland, 1887 (Bacillales: *Bacillaceae*);
- *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884 (Bacillales: *Staphylococcaceae*).

Reino Fungi

- *Aspergillus niger* Tiegh, 1867 (Eurotiales: *Trichocomaceae*);
- *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout, 1923 (Cryptococcales: *Cryptococcaceae*);
- *Penicillium* sp. Link, 1809 (Eurotiales: *Trichocomaceae*).

- Analisar quimicamente por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas os óleos essenciais das pimentas com melhores resultados nos bioensaios.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De acordo com Balbach e Boarim (1992), os diversos tipos de pimentas possuem alto valor histórico, culinário, medicinal, nutricional e também consistem em fonte de estudos para desenvolvimento de diversos produtos. Sua importância remonta desde a medicina oriental, passando pelo império romano, as grandes navegações e o estabelecimento de novas rotas comerciais.

3.1 AS PIMENTAS E A HUMANIDADE

Segundo Perry et al. (2007), a domesticação das pimentas da Família *Solanaceae* teve seu início há mais de 6000 anos, como comprovam achados arqueológicos nas regiões que compreendem Bahamas, México e Andes. Sua propagação pelo mundo se deu por meio das grandes navegações, nas quais os navios espanhóis e portugueses levaram tais condimentos para a Europa e subsequentemente, às suas colônias na África, Ásia e Oceania. Teve como principal personagem o navegador Cristóvão Colombo, que as denominou como “pimentas” devido ao seu sabor e não à aparência, com as pimentas-do-reino, especiaria muito refinada na época.

De acordo com Reifschneider (2000), as pimentas da Família *Piperaceae*, em especial a *Piper nigrum* (as variedades de pimenta-do-reino), condimentam a culinária e auxiliam a medicina há milhares de anos. Documentos da medicina indiana Ayurveda, datada de mais de 4000 anos, relatam a utilização destes frutos para amenizar os efeitos de febres. Na Grécia antiga, Hipócrates a recomendava como combate às doenças estomacais.

Foi levada à Europa por volta do Século X pelos muçulmanos em rota comercial com Gênova e Veneza, mas em volume bem discreto. Ao longo do tempo, sua utilização mostrou-se útil também para a conservação de alimentos, em especial de carnes durante longas viagens, pois aumentavam sua durabilidade e disfarçava o gosto quando começavam a se decompor (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Mas, assim como a disseminação da Família das *Solanaceae*, a pimenta-do-reino teve seu auge na época das grandes navegações do século XV, quando houve

uma verdadeira corrida entre as potências europeias para descobrirem “o caminho das Índias” e estabelecer uma rota comercial nesta região. Anteriormente com sua área de distribuição restrita ao subcontinente indiano, já era bastante conhecida e utilizada até mesmo no Império Romano (LE COUTEUR; BURRESON, 2006).

Os portugueses, primeiros a descobrirem uma rota mais curta rumo às Índias, a denominaram em homenagem ao seu reino (em países de Língua Portuguesa), pois o mesmo tornara-se o maior vendedor desta especiaria. Nos países de Língua Inglesa, é conhecida simplesmente como *black pepper* (pimenta-preta) (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Na época, a especiaria chegou a ser utilizada como dinheiro, tendo seu peso comparado ao ouro, onde por meio da utilização do trabalho escravo nas colônias foi possível o aumento significativo de sua produção, conforme comprovam pinturas da época (Figura 6). Assim, também ficou conhecida como “ouro negro da Índia”. Atualmente, o único paralelo considerável cujo produto natural movimenta tanto a economia mundial, é o petróleo. Sua disseminação pelo mundo se completou com o advento das Companhias das Índias Orientais Holandesa, Britânica e Francesa, do século XVI ao XVIII, quando grandes frotas realizavam as rotas comerciais da Europa para as Índias e Américas, transformando pequenas cidades em movimentados portos (Figura 7) (LE COUTEUR; BURRESON, 2006).

Figura 6 – Cultivo de pimenta-do-reino durante a época das Grandes Navegações



Fontes: Bibliotheque Nationale de France, 2012 (A); Cruz, 2015 (B)

A visão do navegador Marco Polo durante a colheita de pimenta-do-reino nas Índias (A). O trabalho escravo do transporte de pimenta-do-reino para os grandes navios, durante o Brasil Colônia (B).

Figura 7 – Carregamento de pimenta-do-reino no porto de Calcutá, no século XVI



Fonte: Sanghi, 2010

Em suma, biogeograficamente pode-se estabelecer que o berço do cultivo das *Solanaceae* na América Central e o das *Piperaceae*, ocorreu no sul do continente asiático (Figura 8).

Figura 8 – Biogeografia das pimentas pelo mundo



Fonte: Adaptado de Wieczorek, 2014 e Dalby, 2002

As “pimentas vermelhas” originadas ao norte da América do Sul e América Central; a pimenta-do-reino, originária da região sul da Índia.

3.2 AS ESPÉCIES ESTUDADAS

3.2.1 Pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*)

Pertencente à Família *Myrtaceae*, esta pimenta possui diversos nomes populares, entre eles, pimenta-síria, pimenta-da-Jamaica, pimenta-de-coroa, etc. Sua árvore pode chegar aos quinze metros, sendo nativa da região central da Américas e ilhas do Caribe. A madeira é muito utilizada em construções e as flores, como base para produção de mel. Seus frutos são pequenos, e possuem duas sementes em seu interior (Figura 9) (RAO; NAVINCHANDRA; JAYAVEERA, 2012).

Após beneficiados os frutos, as sementes secas são utilizadas na culinária e possuem sabor levemente picante, que lembram noz-moscada, cravo-da-índia e canela (DALBY, 2002).

Segundo Jiang et al. (2013), os principais compostos de seu óleo essencial são o eugenol, o β -cariofileno e o esqualeno.

Figura 9 – Pimenta-da-Jamaica com grãos imaturos



3.2.2 Pimenta-do-reino (*Piper nigrum*)

De acordo com Lorenzi (2009), a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) pertence à Família *Piperaceae* e caracteriza-se como uma planta trepadeira, originária das florestas tropicais no sul da Índia e pode chegar a aproximadamente três metros de altura. Seu plantio é realizado em estacas verticais para o crescimento adequado da planta. O fruto desenvolve-se dentro de bagas, comumente denominadas espigas, conforme evidenciado na Figura 10, apresenta a cor verde quando imaturas e vermelhas quando maduras.

Os principais compostos obtidos em seu óleo essencial são a piperina e a isobutilamidas (ROMÃO et al., 2008; KAPOOR et al., 2009).

Figura 10 – Pimenta-do-reino com grãos imaturos



Fonte: Schöpke, 2004

Em Dalby (2002), é descrito o processo de obtenção das quatro variedades de condimentos de *Piper nigrum*, onde nota-se que a diferenciação no estágio de desenvolvimento dos frutos de uma mesma planta é o que se utiliza para a

preparação dos diferentes tipos de condimentos desta espécie: pimenta-do-reino verde, vermelha, preta e branca (Figura 11).

Figura 11 – Variedades de condimentos preparados com frutos de pimenta-do-reino



Fonte: Ansari, 2015

Em Dalby (2002), é explicado os tipos de processamentos:

- Pimenta-do-reino-verde: são os frutos colhidos antes de atingirem seu total desenvolvimento (cerca de 2/3), consumidos na forma de conservas ou após processados;
- Pimenta-do-reino-preta: os frutos são colhidos ainda imaturos, mas com seu desenvolvimento totalmente completo, geralmente com tonalidade verde-claro ou amarelado. Posteriormente, são levados à secagem, podendo ter sido debulhados ou não. Após a separação das bagas, são deixados para secar sob o sol ou em secadores mecânicos movidos a diesel ou lenha;
- Pimenta-do-reino-branca: são colhidos após o amadurecimento total dos frutos, quando apresentam coloração amarelada ou vermelha, são levados para maceração em salmoura, ainda em bagas. Após determinado período (que varia de um a três dias), é descascada e levada para a secagem sob o sol. Secadores

mecânicos não são muito utilizados, para não perder a qualidade e característica do produto processado;

- Pimenta-do-reino-vermelha: colhidos logo após o ponto de amadurecimento, quando a baga apresenta casca lisa e coloração avermelhada. Após ser realizada a colheita e ser descascada, é processada de forma semelhante à pimenta-do-reino-verde.

De acordo com Dalby (2002), apesar destacarem-se como os maiores produtores de pimenta-do-reino, diversos países asiáticos e também o Brasil, realizam o processamento dessas pimentas, por muitas vezes de maneira artesanal (Figura 12).

Figura 12 – Processamento das variedades de pimenta-do-reino

Secagem dos grãos ao sol, sobre lonas



Separação da bagas



Revolvimento dos grãos



Fonte: Morris, 2011

3.2.3 Pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*)

Segundo Lorenzi (2009), é o fruto da árvore conhecida popularmente como aroeira-vermelha, o qual quando utilizado como condimento, recebe esta denominação. *Schinus terebinthifolius* pertence à Família *Anacardiaceae* e também é conhecida como aguaráíba, aroeira, aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-brejo, aroeira-do-campo, aroeira-do-Paraná, aroeira-mansa, aroeira-negra, aroeira-pimenteira, aroeira-precoce, aroerinha-do-iguapé, cambuí, coração-de-bugre, corneíba, fruto-do-sabiá e poivre-rose.

Lorenzi e Matos (2008) caracterizam-na como uma árvore de estatura pequena a médio porte, geralmente com altura por volta de sete a dez metros (Figura 13), possui caule tortuoso de até 60 cm de diâmetro, com flores pequenas e amareladas, folhas compostas, imparipinadas, de aproximadamente 15 cm e frutos globosos pequenos e avermelhados, agrupados em forma de cachos.

Trata-se de uma planta nativa do Brasil, mas pode ser encontrada em grande parte da América do Sul, onde se adaptou aos mais diversos climas. Mostra ser resistente a climas secos, geadas e estiagens, sendo muito utilizada no paisagismo urbano (LORENZI, 2009).

Conforme Sigrist (2014), a aroeira-vermelha possui valor comercial para produção de cosméticos e fármacos e podem ser utilizadas diversas partes da anatomia da planta. Madeira excelente para mourões, lenha e carvão. Como condimento, pode ser utilizado o fruto maduro inteiro, levemente picante e adocicado ou o fruto seco e moído, que se assemelha à pimenta-do-reino.

Em geral, possui como constituintes químicos: resinas, saponinas esteroidais, taninos, flavonóides, alcalóides, esteróides, monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos, sendo estes três últimos mais encontrados nos frutos (BENDAOUD et al., 2010; MARTINS et al., 2014).

Figura 13 – Espécime de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*)



Fonte: Shop das Plantas, 2015

3.2.4 Pimenta-dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*)

Pertencente à Família *Solanaceae*, a variedade *pendulum*, popularmente conhecida como pimenta-dedo-de-moça, chifre-de-veado, pimenta-vermelha ou calabresa, figura-se como uma das mais comuns nas feiras e nos pratos brasileiros seja *in natura*, em conserva, seca ou moída em flocos (REIFSCHNEIDER, 2000).

Lorenzi (2009) a descreve como uma planta arbustiva, a qual pode chegar a aproximadamente dois metros de altura, que desenvolve frutos longos de aproximadamente 7 cm, de cor verde-escuro quando imaturos e variando sua coloração entre verde claro, amarelo e somente quando amadurecidos, um tom vermelho vivo. Trata-se de uma planta muito utilizada devido à sua beleza paisagística, sendo de fácil manejo dentro de residências, em vasos ornamentais (Figura 14).

Seus principais constituintes químicos são carotenoides, capsaicinóides e compostos fenólicos, dentre os quais se destacam a capsaicina e a piperina (MORAES et al., 2012).

Figura 14 – Vaso ornamental de pimenta-dedo-de-moça



Fonte: Horto Botânico Paisagismo, 2014

3.2.5 Pimenta-biquinho (*Capsicum chinense*)

Conhecida como pimenta-de-bico, pimenta-bico ou pimenta-biquinho, é uma variedade bastante apreciada na região sudeste do Brasil, principalmente no Estado de Minas Gerais. Inicialmente utilizada somente como decoração, atualmente é muito utilizada principalmente por possui ardência muito baixa e ainda assim, manter o sabor característico das pimentas vermelhas, muitas vezes é consumida *in natura* e inteira, como aperitivo (REIFSCHNEIDER, 2000).

Trata-se de um arbusto relativamente pequeno e que atinge um metro de altura (Figura 15). Seus frutos maduros são de um tom vermelho vivo intenso e possuem aproximadamente 2,5 cm, sendo que apresentam um prolongamento em

sua parte inferior com aproximadamente 0,5 cm, característica que originou seu nome popular (LORENZI; MATOS, 2008).

Pertence à Família *Solanaceae* e possui como principais constituintes químicos a capsaicina e a piperina (DOMENICO et al., 2012).

Figura 15 – Planta de pimenta-biquinho



Fonte: São Paulo, 2010

3.2.6 Pimenta-bode (*Capsicum chinense*)

Conforme Linguanotto Neto (2007), a variedade comumente conhecida como pimenta-bode, é largamente utilizada na culinária de Goiás.

Lorenzi (2009) a descreve como uma planta arbustiva pertencente à Família *Solanaceae*, geralmente possui uma estatura de aproximadamente dois metros de altura e apresenta frutos verdes (imaturos), amarelo ou vermelho (maduros), com cerca de 2 cm, arredondados ou achatados, muito semelhante à pitanga (Figura 16).

Possui como principais constituintes químicos a capsaicina e a piperina (DOMENICO et al., 2012).

Nessa espécie, existem duas variedades híbridas muito famosas, uma denominada Bhut Jolokia, Naga Jolokia ou pimenta-fantasma, de origem na Índia e a outra, Trinidad Scorpion Moruga, de Trinidad e Tobago. Ambas já constaram no livro Guinness de recordes mundiais, como as pimentas mais ardidas do mundo, mas hoje, ocupam o terceiro e o segundo lugar, respectivamente, de acordo com a Escala de Scoville (LINGUANOTTO NETO, 2007).

Figura 16 – Planta de pimenta-bode



Fonte: Planeta Sementes, 2014

3.2.7 Pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens*)

Com cultivo amplamente disseminado no Brasil, a planta da pimenta-malagueta atinge aproximadamente dois metros (Figura 17). Seu frutos podem atingir até 3 cm de diâmetro e 7,5 cm de comprimento, mas apesar de seu tamanho, possuem poucas sementes nestes (DALBY, 2002).

Originária da América Central é amplamente utilizada na culinária na preparação de pratos, também é utilizada em conservas de azeite ou vinagre. Possui um grau de ardência mediano (LINGUANOTTO NETO, 2007).

Pertence à Família *Solanaceae* e possui como principais constituintes químicos a capsaicina e a piperina (DOMENICO et al., 2012).

Figura 17 – Planta de pimenta-malagueta



Fonte: São Paulo, 2010

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

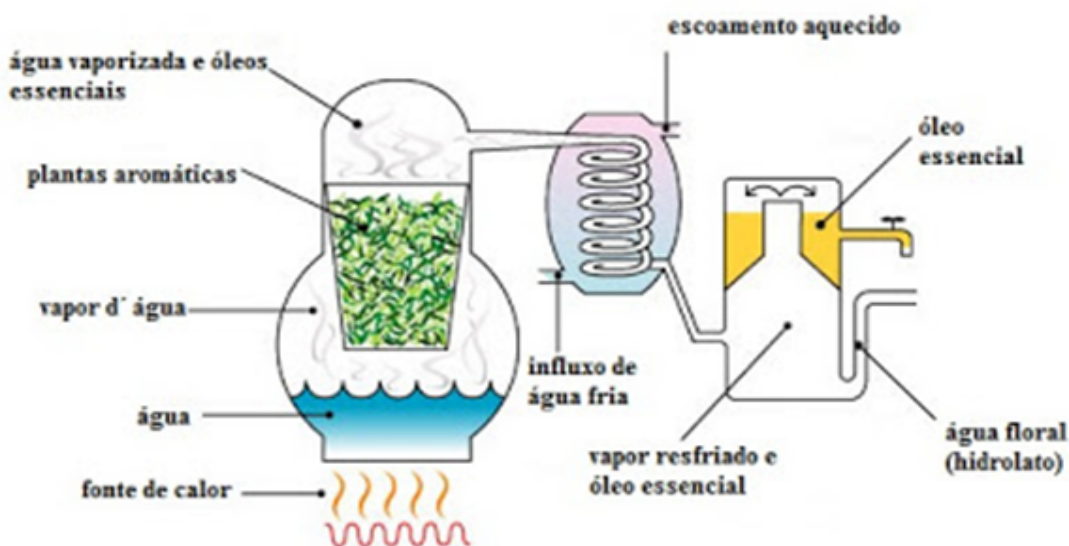
Atualmente, com o grande avanço tecnológico, existe uma gama bem variada de métodos de extração para os óleos essenciais. Dentre os diversos processos utilizados para a obtenção de oleoresinas ou óleos essenciais dos vegetais, o que pode variar é o tipo de produto que se espera obter ou se o mesmo pode sofrer degradação sob altas temperaturas ou mediante utilização de solventes.

A diferença entre oleoresinas e óleos essenciais é que o primeiro é um extrato bruto, que pode conter ou não óleo essencial e outros compostos (pigmentos, ácidos graxos, etc.). Já o óleo essencial é o composto obtido por meio de destilação por arraste a vapor, hidrodestilação ou métodos derivados desse, como o método Clevenger (HOARE, 2010).

3.3.1 Destilação por arraste a vapor

Configura-se como o método mais utilizado para a extração de óleos essenciais. É um processo simples, cuja matéria vegetal é submetida à ação do vapor d'água, extraindo substâncias pelo arraste de vapor (Figura 18). O vapor d'água passa pela amostra vegetal, arrastando as moléculas de óleo essencial. Ao passar pela serpentina de condensação, o vapor se resfria e condensa. Em seguida, é possível a separação da água e do óleo obtido por extração com solvente (NOGUEIRA, 2003).

Figura 18 – Esquematisação de um processo de destilação por arraste a vapor

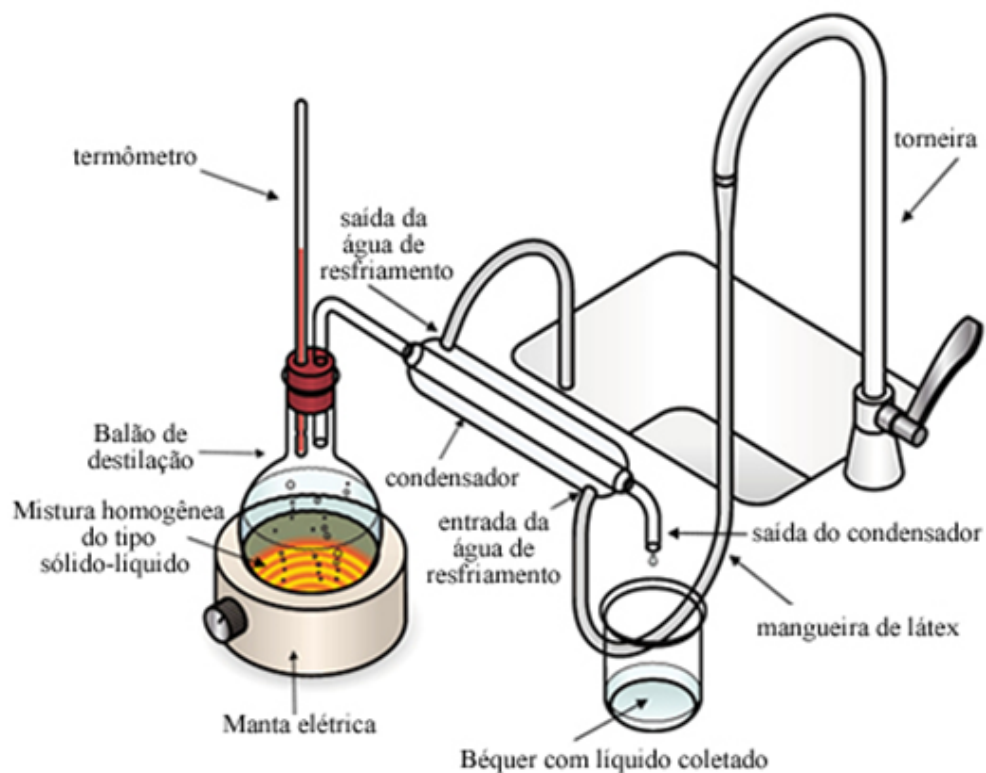


Fonte: Hoare, 2010

3.3.2 Hidrodestilação

Neste método, o material vegetal é totalmente mergulhado na água (Figura 19). A amostra vegetal fica mergulhada em contato direto com a água no balão de destilação, sendo que com o aumento da temperatura, ocorre a evaporação das moléculas de óleo essencial, em temperatura inferior à de ebulição da água. Ao passar pelo condensador, o vapor se resfria e retorna ao estado líquido, o qual escorre para o reservatório final. Possibilita-se assim, a obtenção de substâncias sensíveis à alta temperatura (CUNHA, 2009).

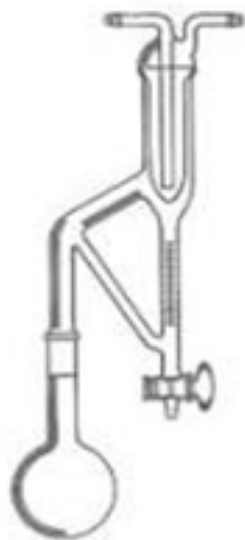
Figura 19 – Esquemáticação de um processo de hidrodestilação



Fonte: Fogaça, 2013

Conforme Simões et al. (2007), o método Clevenger é uma variação da Hidrodestilação, em que somente a aparelhagem é diferenciada (Figura 20).

Figura 20 – Esquema da vidraria utilizada para o método Clevenger

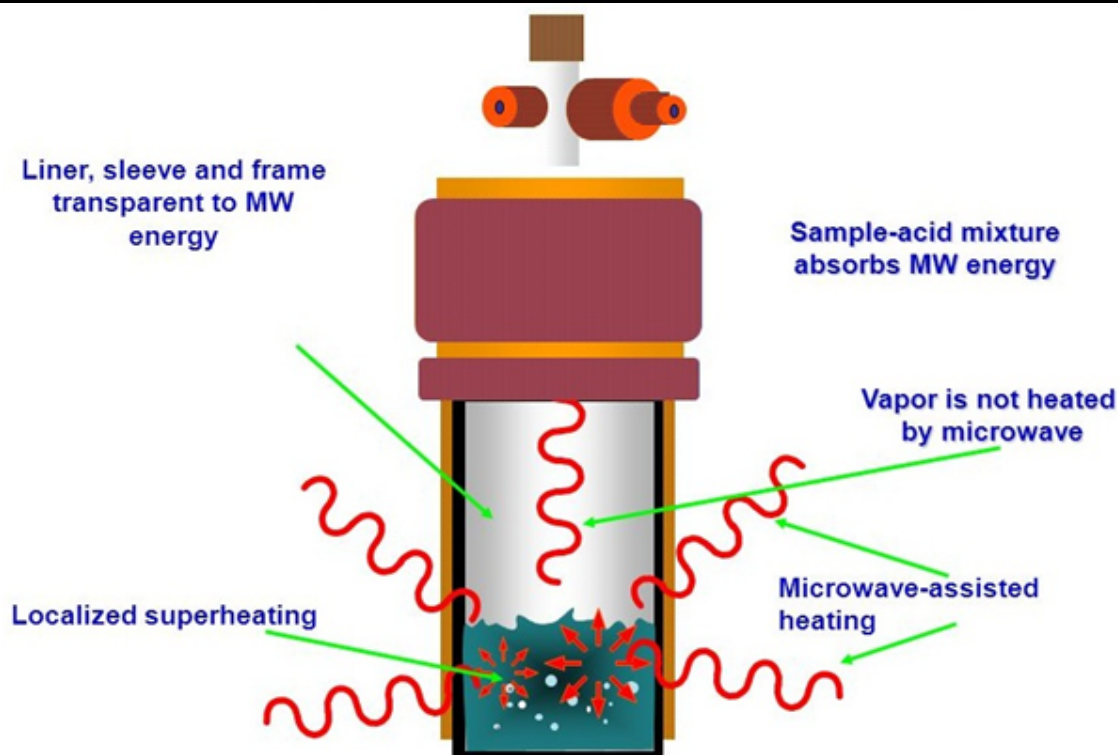


Fonte: Constantino, Silva e Donate, 2004

3.3.3 Micro-ondas

A radiação absorvida pelos materiais causa aumento de sua temperatura devido ao movimento molecular do mesmo e pela interação da radiação eletromagnética com os íons da amostra. Dessa forma, a energia gasta para o aquecimento através de micro-ondas é muito menor que a energia necessária para romper as ligações das moléculas orgânicas mais comuns em outras formas de aquecimento (Figura 21) (NEAS; COLLINS, 1989).

Figura 21 – Digestão de amostras por radiação micro-ondas



Fonte: Fernandes, 201-?

Todas as amostras são submetidas às mesmas condições de temperatura e pressão. As células são rompidas de dentro para fora, expondo seu interior ao meio extracelular, juntamente com as moléculas de óleos essenciais.

3.3.4 Digestão de amostras (extração por solventes)

Alguns constituintes vegetais podem ser degradados quando submetidos a temperaturas mais elevadas. Dessa forma, para a extração, faz-se necessária a utilização de um método menos agressivo às moléculas, com a utilização de

solventes como o hexano, éter de petróleo, entre outros. Pode ser feita com a utilização de almofariz com pistilo, através dos métodos de maceração, esmagamento, trituração, entre outros (Figura 22) (ROBBERS; SPEEDIE, 1997).

Figura 22 – Almofariz e pistilo com pimentas em grãos



Fonte: Baumel, 2013

3.3.5 Soxhlet

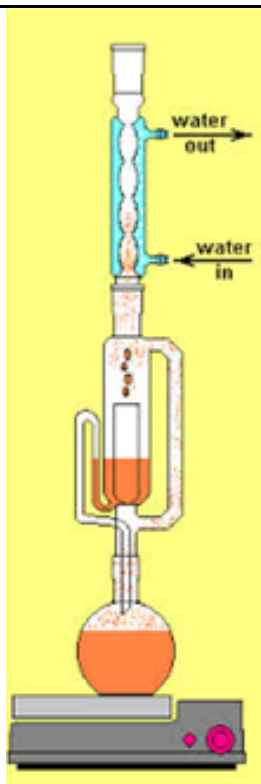
Forma de extração contínua na qual se utiliza um solvente quente. Em tal método, faz-se o uso de uma quantidade relativamente pequena de solvente e nota-se que tal método apresenta bons resultados. A extração ocorre normalmente por centenas de ciclos, o que corresponde, às vezes, em vários dias de trabalho. O princípio ativo desejado é resgatado da solução final do balão, a qual é concentrada em evaporador rotativo, a baixa pressão (CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2004).

Para sua extração por arraste a vapor, utiliza-se o extrator Soxhlet (Figura 23) que funciona ciclicamente de forma que, quando o solvente condensado ultrapassa certo volume, este escoar de volta para o balão, onde é aquecido, e novamente evaporado. Os solutos são concentrados no balão. O solvente, quando entra em contato com a fase sólida, está sempre puro, pois vem de uma destilação (COSTA; DIAS; GUIMARÃES, 2004).

No reservatório do extrator é colocada a amostra vegetal envolta em papel de filtro ou coberta por algodão. No balão, fica o solvente e no condensador, há fluxo de água para resfriamento. O balão é aquecido com uma manta elétrica de modo que o solvente entre em ebulição. O vapor condensa e goteja sobre o cartucho, o qual solubiliza o óleo essencial para extração.

O extrator Soxhlet possui um sifão que permite o refluxo contínuo do solvente. Quando o reservatório enche e atinge a altura do sifão, este transborda levando o solvente e o extrato para o balão (CUNHA, 2009).

Figura 23 – Esquemática de um extrator Soxhlet



Fonte: Guidotti, 2013

3.3.6 Ultrassom

Processo que utiliza a energia de ondas sonoras para criar vibrações, que variam a pressão nas moléculas, causam cavitação (a combinação entre a pressão, a temperatura e a velocidade resulta na liberação de ondas de choque e microjatos altamente energéticos, causando a aparição de altas tensões mecânicas e elevação

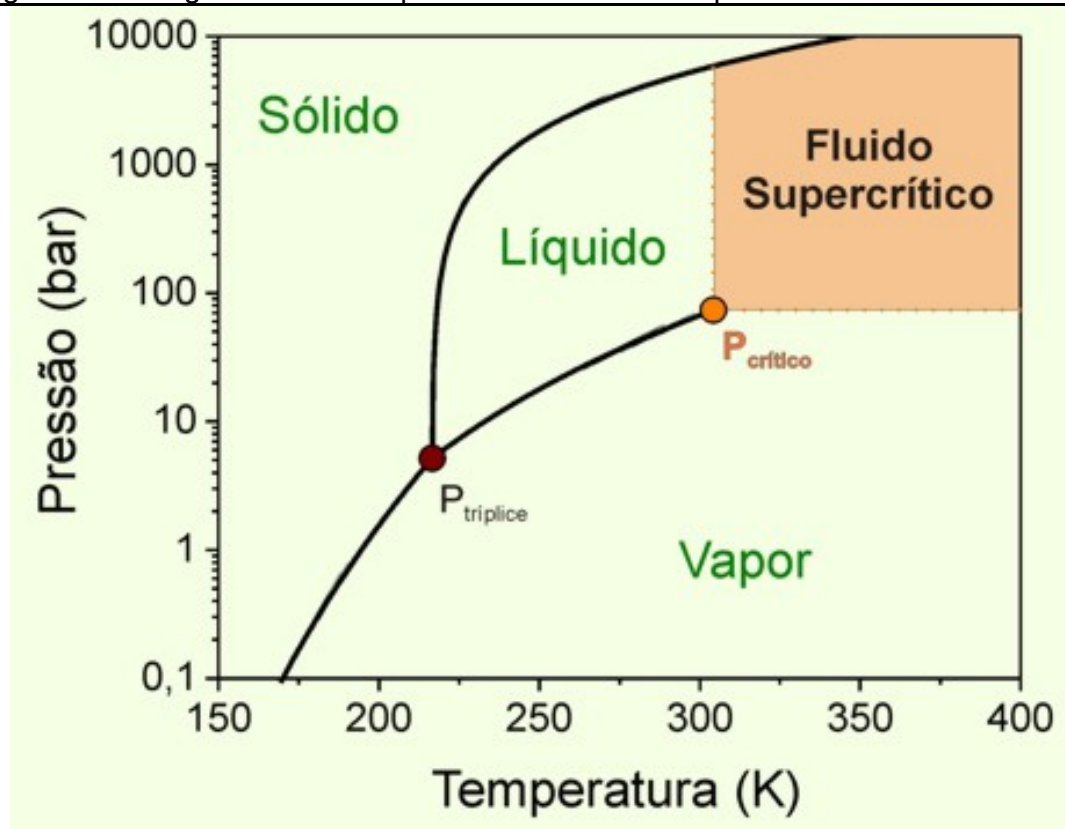
da temperatura, que então separa as moléculas) e dessa forma, libera os óleos essenciais para extração (LUZ, 1998).

3.3.7 Extração com fluido supercrítico

Fluido supercrítico é o estado denominado em que um gás é submetido a tal temperatura e pressão, que fica em um estado intermediário entre gás e líquido (Figura 24). Dessa forma, se difunde como gás e dissolve materiais como líquidos, podendo separar ou incorporar outras moléculas, agindo assim como solventes (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996).

Do ponto de vista ambiental, possui impacto mínimo devido à utilização de gases menos nocivos ou até mesmo inertes (no caso do CO_2), além de possuir menor custo e ser biocompatível (FILIPPIS, 2001).

Figura 24 – Diagrama de fases para CO_2 em estado supercrítico



Fonte: Universidade de São Paulo, 201-?

A área na qual se delimita "fluido supercrítico" apresenta pressão e temperaturas ideais, que permitem a utilização de CO_2 como solvente.

3.4 MICRORGANISMOS ESTUDADOS

Os microrganismos selecionados para este estudo foram especialmente escolhidos, devido à incidência de contaminação alimentar oriunda destes, ou mesmo pela grande ocorrência de casos clínicos. Serão aqui apresentados por ordem alfabética (excetuando as figuras), de acordo com seu Filo e nomenclatura.

Foram alvos do presente estudo:

- As bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Figura 25);
- Os fungos *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Penicillium* sp. (Figura 26).

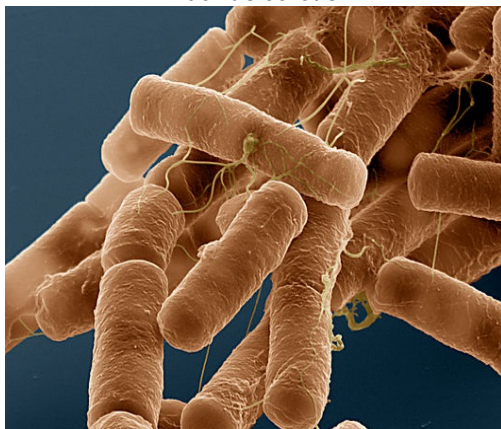
Figura 25 – Bactérias utilizadas nos bioensaios

Escherichia coli



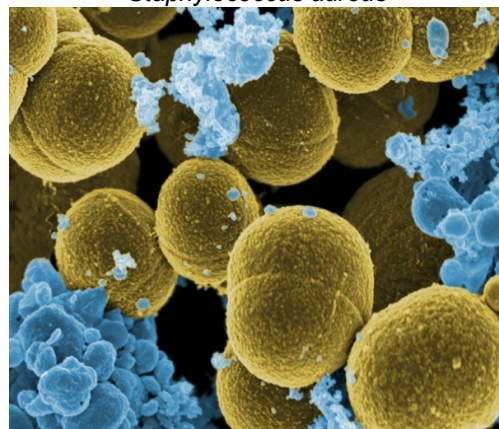
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2015

Bacillus cereus



Fonte: Allen-Gentry, 2012

Staphylococcus aureus



Fonte: Pekok, 2008

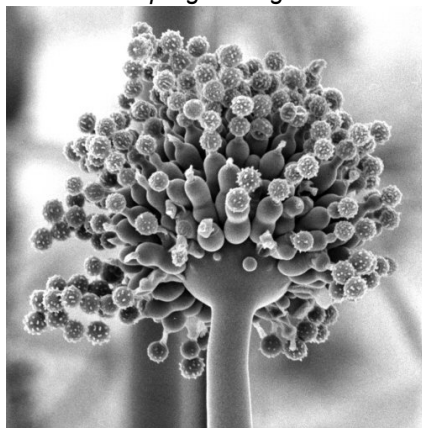
Figura 26 – Fungos utilizados nos bioensaios

Candida albicans



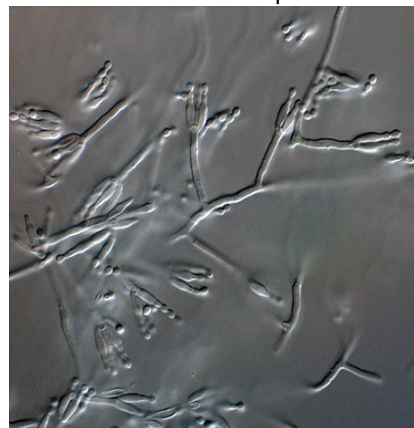
Fonte: Tsafrir, 2011

Aspergillus niger



Fonte: Microbewiki, 2007

Penicillium sp.



Fonte: Visagie, 2014

3.4.1 As Bactérias estudadas

3.4.1.1 *Bacillus cereus*

Pertencente à Família *Bacillaceae*, *B. cereus* é uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada em forma de esporos no solo. Assim, causam grande contaminação principalmente em vegetais, durante a colheita (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Possuem cepas benéficas, sendo utilizadas como probióticos em nutrição animal. As cepas patogênicas causam intoxicações alimentares, podendo acarretar intensos quadros de vômitos e diarreias. Em casos extremos, pode levar à morte.

O preparo e armazenamento correto dos alimentos consiste na principal medida profilática para se evitar contaminação por *B. cereus* (WINN et al., 2008).

3.4.1.2 *Escherichia coli*

E. coli pertence à Família *Enterobacteriaceae* e trata-se de uma bactéria bacilo Gram-negativa que vive normalmente e de forma inofensiva na microbiota humana da flora intestinal, mas algumas cepas podem causar graves infecções em caso de infecção, a qual determina dores abdominais severas, náuseas, vômitos e diarreias com sangramentos. Em casos mais graves, pode levar à falência renal e até mesmo a morte (INDU et al., 2006).

A contaminação com cepas mais agressivas se deve a ingestão de água ou alimentos impróprios para o consumo devido à contaminação por fezes, seja pela manipulação ou por descuidos no momento do preparo. Nas mulheres, também pode haver contaminação urinária devido à proximidade do ânus e da uretra. Também é possível a contaminação através de contato direto com ambiente contaminado (MURRAY, 2002).

A maneira mais eficiente de prevenção é a higienização durante o preparo dos alimentos, bem como a devida sanitização dos alimentos a serem consumidos crus (VERMELHO et al., 2006).

3.4.1.3 *Staphylococcus aureus*

Pertencente à Família *Staphilococcaceae*, *S. aureus* é uma bactéria coco Gram-positiva. Presente na microbiota natural em mais de 25% da população saudável, é comum na pele, garganta, olhos, ouvidos e narinas, nem sempre sendo prejudicial ao seu hospedeiro. Quando patogênica, é devido à liberação de enzimas tóxicas ao organismo hospedeiro, que podem causar infecções de pele, abscessos, sinusites, amidalites, conjuntivites, gastroenterites, endocardites, pneumonias, septicemia, etc. em casos mais graves, pode levar à morte (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Pelo fato de possuir diversos fatores específicos, como meios para driblar o sistema imunológico do hospedeiro, atualmente existem cepas altamente resistentes a vários tipos de antibióticos, sendo denominadas superbactérias. A prevenção dá-se pelo processo de higienização, principalmente das mãos, com produtos higienizantes ou sanitizantes (MURRAY, 2002).

A infecção para estes microrganismos pode ocorrer pelo contato com fômites (objetos contaminados), alimentos manipulados de maneira indevida ou com armazenagem incorreta, em ambientes com pessoas infectadas, ou mesmo através do ar por meio de partículas de salivas expelidas no momento de tosses ou espirros (WINN et al., 2008).

3.4.2 Os fungos estudados

3.4.2.1 *Aspergillus niger*

Pertencente à Família *Trichocomaceae*, *A. niger* é um fungo muito comum no ambiente e possui conformação em longa haste com pedúnculo em sua extremidade, de coloração escura, popularmente denominado como mofo-preto. Grande contaminante em alimentos, pois são decompositores destes e trata-se de um organismo que necessita de umidade para se desenvolver, mas pode tolerar temperaturas extremas, sem prejudicar suas estruturas ou reprodução (LACAZ et al., 2002).

Como agente patogênico, pode causar desde reações alérgicas, infecções pulmonares, afecções na pele e em casos extremos, disseminação invasiva em diversos sistemas do organismo (XAVIER et al., 2008).

3.4.2.2 *Candida albicans*

Pertencente à Família *Cryptococcaceae*, *C. albicans* é um fungo que pode se apresentar na forma de levedura, filamentosa ou pseudo-hifa (LACAZ et al., 2002).

Muito comum na microbiota normal humana, já que cerca de 80% da população humana possui este em seu trato digestório e/ou urinário. Em níveis normais, não causam infecções. Mas com o crescimento excessivo destes no organismo, podem causar micoses ou quadros de candidíases, caracterizados por coceira, ardência, vermelhidão e/ou placas brancas, que podem ocasionar mau cheiro e corrimento no local afetado (COUTO; CARLOS; MACHADO, 2011).

De acordo com Lacaz et al. (2002), por não possuir um quadro específico para sua propagação, um conjunto de fatores propicia sua disseminação no organismo. Baixa imunidade, relações sexuais, estresse, antibioticoterapia, hormônios, entre outros causam o descontrole dos níveis normais de *Candida albicans*, principalmente em mulheres causando vulvovaginites (CHAVES; SANTOS; CAJUEIRO, 2015).

Em casos especiais, como em doentes imunossuprimidos, transplantados, pacientes em quimioterapia e doentes graves internados em CTIs, os materiais hospitalares como cateteres e sonda ficam suscetíveis à contaminação por *Candida albicans* através da formação de biofilmes em sua superfície, podendo acarretar uma infecção generalizada denominada candidemia, que se não tratada adequadamente, pode deixar sequelas ou ocasionar a morte (FOX et al., 2015).

3.4.2.3 *Penicillium* sp.

Pertencente à Família *Trichocomaceae*, os fungos do gênero *Penicillium* são decompositores de matéria orgânica. Comumente é conhecido como o bolor do pão, mas pode ser encontrado no solo e em outros ambientes escuros e úmidos. Muito importante na agricultura, é grande responsável por grandes perdas devido a ser facilmente disseminado, principalmente em grãos estocados (LACAZ et al., 2002).

Algumas espécies podem ser benéficas, auxiliando o homem tanto no desenvolvimento de medicamentos (penicilina), como no preparo de alimentos; outras podem ser nocivas devido à produção de micotoxinas que podem causar febres, anemias, problemas pulmonares e renais, podendo evoluir para morte (SOUZA et al., 2004).

3.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A cromatografia é um método de análise ou separação dos componentes de uma amostra entre duas fases, sendo uma móvel e outra estacionária. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, os componentes da amostra são distribuídos entre as duas, de tal forma que alguns compostos terão maior afinidade pela fase móvel, enquanto outros terão maior afinidade pela fase estacionária. Obtém-se desta forma uma separação dos compostos da amostra tendo-se migrações diferenciais destes pela fase estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

A Cromatografia Gasosa é utilizada para separação e análise de compostos voláteis. Em CG, a fase móvel é um gás inerte (normalmente He) e a fase estacionária um polímero sob um sólido inerte. Em CG vários detectores podem ser utilizados, mas a Espectrometria de Massas (EM) é a técnica mais utilizada para a identificação dos componentes de óleos essenciais. Na EM a amostra é ionizada e detectam-se o pico do íon molecular, bem como os fragmentos obtidos dessa ionização. Os métodos de ionização mais empregados em CG-EM são ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

3.6 CURIOSIDADES SOBRE PIMENTAS

Para classificar a ardência quando se ingere pimentas, o farmacêutico Wilbur Scoville (1865-1942) elaborou o experimento denominado Teste Organoléptico de Scoville ou Procedimento de Diluição e Prova. Consistia em verificar a taxa de concentração da capsaicina através da diluição do extrato da pimenta pura em um copo de água com açúcar e então degustado por voluntários. Quanto mais água com açúcar fosse necessário para que a ardência não fosse perceptível ao paladar dos participantes, maior seria o grau na escala (DEWITT, 2003).

A Escala Scoville faz o cálculo de quantas mil xícaras de água são necessárias para diluir uma xícara de extrato puro de pimenta. Este grau varia de 0

a 16 milhões (Figura 27). Em resumo: 1 xícara de pimenta = 1000 xícaras de água = 1 grau Scoville (DEWITT; BOSLAND, 1997).

Figura 27 – Representação da Escala de Scoville



Fonte: Lindo's Pharmacy Company, 2014

Tuma (2015) denomina as pimentas com mais de 1 milhão de graus como “pimentas atômicas”. Em frutos, atualmente se tem o grau 2,2 milhões. Acima deste valor, somente extrato puro de óleo essencial.

Atualmente, de acordo com o Guinness Book 2015, as quatro pimentas mais ardidas do mundo (Figura 28) são:

- 4.º lugar – 7 Pot Douglah e variedades: de 1,06 a 1,3 milhões de graus;
- 3.º lugar – Bhut Jolokia e variedades: de 1,10 a 1,4 milhões de graus;
- 2.º lugar – Trinidad Scorpion Moruga e variedades: de 1,40 a 2 milhões de graus;
- 1.º lugar – Carolina Reaper: até 2,2 milhões de graus.

Em comparação, a pimenta com o menor índice na escala, assim como as pimentas objetos do presente estudo (por grau de ardência) (DEWITT, 2003; DEWITT; BOSLAND, 1997; GAHUNGU et al., 2011):

- Pimentão: 0 grau;
- Pimenta-biquinho: de 500 a 1.000 graus;
- Pimenta-dedo-de-moça: de 1.000 a 1.500 graus;
- Pimenta-bode: de 15.000 a 30.000 graus;
- Pimenta-malagueta: 100.000 graus.

Por não possuírem capsaicina, a pimenta-do-reino, pimenta-da-Jamaica e pimenta-rosa não foram mensuradas.

Figura 28 – As quatro pimentas mais ardidas do mundo, segundo o Guinness World Records 2015

4.º lugar: Exemplares de 7 Pot Douglah



Fonte: Hell Hot Peppers, 2015

3.º lugar: Exemplares de Bhut Jolokia



Fonte: Tuma, 2015

2.º lugar: Exemplares de Trinidad Scorpion



Fonte: Tuma, 2015

1.º lugar: Exemplares de Carolina Reaper



Fonte: Tuma, 2015

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÕES

As pimentas foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Uberaba, MG. Essas foram limpas, secas e pesadas. Em seguida foi realizada a extração dos óleos essenciais das especiarias pelos métodos Soxhlet e pelo método Clevenger.

Para a extração pelo método Soxhlet, as pimentas foram acondicionadas no reservatório do extrator Soxhlet envoltas em algodão, separadamente. Como solvente para a extração, foi utilizado acetona. As extrações tiveram pelo menos 2 horas de duração.

Para a extração pelo método Clevenger as pimentas foram acondicionadas no balão de destilação, juntamente com água destilada. As extrações tiveram 3 horas de duração.

4.2 BIOENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA

Devido à grande quantidade de óleos essenciais e microrganismos a serem utilizados, foram empregadas duas técnicas: difusão em disco de papel e microdiluição. Os microrganismos avaliados neste estudo foram:

Bactérias:

- *Bacillus cereus* (ATCC® 11778™);
- *Escherichia coli* (ATCC® 35218™).
- *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™).

Fungos:

- *Aspergillus niger* (Cepa ambiental);
- *Candida albicans* (ATCC® 10231™);
- *Penicillium* sp. (Cepa ambiental).

4.2.1 Difusão em disco de papel

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi obtida primeiramente pelo método de difusão de disco de papel (NCCLS, 1997).

A suspensão de microrganismos testados foi espalhada sobre as placas de Petri de 60 x 15 mm contendo meio sólido de Mueller-Hinton. Os discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com 15 µl de óleo essencial ou oleoresina, separadamente e colocados sobre as placas inoculadas. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas para as bactérias, sendo então os diâmetros dos halos de inibição aferidos em milímetros. Quando o diâmetro do halo de inibição era menor ou igual a 6 mm, a amostra testada foi considerada não ativa.

4.2.1 Microdiluição em caldo

Em uma segunda etapa do estudo, a atividade antifúngica e antibacteriana, bem como a concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais foi testada contra os microrganismos estudados, conforme o método de diluição de caldo em microplaca (meio de cultura BHI para fungos e meio de cultura Mueller-Hinton para bactérias), conforme NCCLSM27-A2, M3 e Cleff et al. (2010).

Para a verificação da CMI contra os microrganismos estudados foram feitas diluições dos óleos essenciais entre 1,0 – 0,05%, em duplicata. Além disso, controles positivos para cada bactéria e cada fungo e os controles negativos, contendo somente o meio de cultura foram utilizados.

Após 72 horas de crescimento a 27°C para os fungos e 24 horas a 37°C para as bactérias, cada poço das microplacas foi observado individualmente. Em caso de turbidez, a amostra foi considerada inativa.

4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Os óleos essenciais de pimenta-rosa e de pimenta-da-Jamaica foram analisados por CG-EM em colaboração com a empresa Ourofino Agrociência, localizada em Uberaba, MG. Para a análise dos óleos essenciais, esses foram

diluídos em metanol na concentração de 1µL/mL e o equipamento utilizado foi o Shimadzu GC-MS 2010 acoplado a um detector quadropolo, com uma coluna VF-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm de espessura do filme). Um µL de cada óleo foi injetado separadamente no modo Split 1:20, a temperatura do injetor foi de 250°C, a energia de ionização foi estabelecida em 70 eV, a temperatura do forno iniciou em 50°C e foi programada para 250°C a uma velocidade de 3°C/min e foi, então, mantida constante por 10 min. A identificação dos compostos foi feita com base na comparação de seus espectros de massas e seus índices de retenção relativos com o National Institute of Standards and Technology Library (STEIN, 2015).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Um breve estudo estatístico foi desenvolvido para fins de verificação do efeito das variáveis independentes, tipo de pimenta e método de extração, sobre o rendimento de extração. Para tanto, foi obtido um quadro de análise de variâncias (ANOVA). Nesta análise, pode-se verificar os efeitos dos tipos de pimenta, da metodologia de extração e da interação entre as variáveis método e pimenta sobre a variável resposta: o rendimento da extração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 EXTRAÇÕES

Os óleos essenciais/oleoresinas das pimentas foram extraídos por dois métodos diferentes de extração para comparação, tanto do rendimento percentual, quanto da atividade biológica dos óleos essenciais/oleoresinas obtidos.

Os métodos Soxhlet e Clevenger foram escolhidos por serem os mais utilizados para extração de óleos essenciais de forma geral.

A partir da Tabela 1, observam-se os dados de extração dos óleos essenciais e oleoresinas das pimentas em estudo utilizando-se Clevenger e Soxhlet como métodos de extração.

Observa-se a partir da Tabela 1 que as extrações das pimentas em grão geraram uma quantidade bem menor de oleoresina (método Soxhlet), como de óleo essencial (método Clevenger) em comparação às pimentas *in natura*, o que é de se esperar, visto que a quantidade de óleo essencial nas pimentas em grão é realmente muito pequena.

Entretanto, mesmo em menor quantidade, o rendimento percentual de óleos essenciais/oleoresinas obtidos para as pimentas em estudo foi satisfatório.

Tabela 1 – Dados sobre a extração de óleos essenciais/oleoresinas das pimentas estudadas

Óleos essenciais extraídos pelo método Clevenger				
Pimentas	Massa inicial (g)	Tempo de extração (min)	Massa de óleo essencial (g)	Rendimento Percentual (%)
<i>P. dioica</i>	37,28	120	1,02	2,74
<i>P. nigrum</i> (b)	40,12	120	0,6	1,50
<i>P. nigrum</i> (p)	40,21	100	0,75	1,90
<i>S. terebinthifolius</i>	36,09	120	0,61	1,70
<i>C. baccatum</i>	112,33	85	7,72	6,90
<i>C. chinense</i> (bq)	39,38	80	7,44	18,90
<i>C. chinense</i> (b)	40,12	120	0,61	1,52
<i>C. frutescens</i>	81,28	70	8,69	10,70
Oleoresinas extraídas pelo método Soxhlet				
Pimentas	Massa inicial (g)	Tempo de extração (min)	Massa de oleoresina (g)	Rendimento Percentual (%)
<i>P. dioica</i>	35,96	120	2,49	6,92
<i>P. nigrum</i> (b)	30,14	100	3,60	11,95
<i>P. nigrum</i> (p)	60,20	100	4,91	8,16
<i>S. terebinthifolius</i>	30,06	125	4,11	13,70
<i>C. baccatum</i>	100,39	135	71,43	71,15
<i>C. chinense</i> (bq)	47,90	90	13,90	29,02
<i>C. chinense</i> (b)	75,51	135	48,48	64,20
<i>C. frutescens</i>	80,05	120	40,10	50,10

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2015

5.2 BIOENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

A partir da Tabela 2 observam-se os dados dos bioensaios de atividade antibacteriana e antifúngica dos óleos essenciais e oleoresinas extraídos com o método Soxhlet e com o método Clevenger das pimentas em estudo, pelo método de difusão em disco de papel.

Tabela 2 – Dados dos bioensaios de atividade antibacteriana dos óleos essenciais/oleoresinas extraídos das pimentas estudadas

Óleos essenciais extraídos pelo método Clevenger			
Pimentas	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. dioica</i>	24,2	10,7	20,2
<i>P. nigrum</i> (b)	19	7,5	5
<i>P. nigrum</i> (p)	11,2	9,4	5,1
<i>S. terebinthifolius</i>	31,2	9,4	14,6
<i>C. baccatum</i>	-	-	-
<i>C. chinense</i> (bq)	2,4	-	-
<i>C. chinense</i> (b)	-	-	-
<i>C. frutescens</i>	-	-	-

Oleoresinas extraídas pelo método Soxhlet			
Pimentas	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. dioica</i>	14,4	10,9	10,1
<i>P. nigrum</i> (b)	33,6	9,4	8
<i>P. nigrum</i> (p)	20,0	7,6	12,7
<i>S. terebinthifolius</i>	17,9	28	14,6
<i>C. baccatum</i>	19,2	-	-
<i>C. chinense</i> (bq)	14,6	4,9	-
<i>C. chinense</i> (b)	12,7	-	-
<i>C. frutescens</i>	11,9	6,1	-

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2015

Através do método de difusão em disco de papel, os melhores resultados das oleoresinas obtidas por Soxhlet contra cada microrganismo: *Bacillus cereus* – *Piper nigrum* (branca) (33,6 mm), *Escherichia coli* – *Schinus terebinthifolius* (28 mm), *Staphylococcus aureus* – *Schinus terebinthifolius* (14,6 mm). Através do método de difusão em disco de papel, os melhores resultados dos óleos essenciais obtidos por Clevenger contra cada microrganismo: *Bacillus cereus* – *Schinus terebinthifolius* (31,2 mm), *Escherichia coli* – *Pimenta dioica* (10,7 mm), *Staphylococcus aureus* – *Pimenta dioica* (20,2 mm).

Segundo os dados de atividade biológica, observa-se que quanto ao controle do microrganismo *Bacillus cereus*, a oleoresina de pimenta-do-reino-branca (Soxhlet) e o óleo essencial de pimenta-rosa (Clevenger), mostraram-se mais eficientes com 33,6 e 31,2 mm de halo de inibição, respectivamente.

Já para *Staphylococcus aureus* a oleoresina de pimenta-rosa (Soxhlet) e o óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (Clevenger) foram os mais ativos com 14,6 e 20,2 mm de halo de inibição, respectivamente.

Analisando-se os dados obtidos para *Escherichia coli*, observa-se que a oleoresina de pimenta-rosa (Soxhlet) e o óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (Clevenger), apresentaram os resultados mais expressivos de atividade biológica com 28 e 10,7 mm de halo de inibição, respectivamente.

De forma geral pode-se dizer que as oleoresinas (método Soxhlet) obtidas a partir de pimenta-do-reino-branca e de pimenta-rosa, apresentaram os melhores resultados frente aos microrganismos testados. Já os óleos essenciais (método Clevenger), obtidos de pimenta-rosa e de pimenta-da-Jamaica, foram os que apresentaram os melhores resultados de atividade antibacteriana contra as bactérias testadas.

Os óleos essenciais das pimenta-dedo-de-moça, pimenta-malagueta, pimenta-biquinho e pimenta-bode não apresentaram atividade biológica através de difusão em disco de papel. Já as oleoresinas, utilizando a mesma técnica, apresentaram atividade biológica contra *Bacillus cereus*. Como dentro o pesquisado não foram encontrados registros sobre a utilização dos óleos essenciais/oleoresinas destas pimentas para atividade antibacteriana e antifúngica frente aos microrganismos deste estudo, não foi possível estabelecer um comparativo com outras literaturas científicas. Embora as oleoresinas dessas pimentas tenham apresentado bioatividade por vezes discreta, esses são dados muito relevantes.

Considerando o método de microdiluição em caldo, no qual foi avaliada a atividade antifúngica das oleoresinas e óleos essenciais obtidos pelos métodos de Soxhlet e Clevenger e a concentração mínima inibitória (CMI), os resultados observados foram dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos essenciais/oleoresinas para os fungos estudados

Óleos essenciais extraídos pelo método Clevenger			
Pimenta	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. sp.</i>
<i>P. dioica</i>	0,25%	0,25%	0,25%
<i>P. nigrum</i> (b)	-	0,50%	-
<i>P. nigrum</i> (p)	-	-	-
<i>S. terebinthifolius</i>	-	0,25%	0,25%
<i>C. baccatum</i>	-	-	-
<i>C. chinense</i> (bq)	-	-	-
<i>C. chinense</i> (b)	-	-	1,00%
<i>C. frutescens</i>	-	-	-
Oleoresinas extraídas pelo método Soxhlet			
Pimenta	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. sp.</i>
<i>P. dioica</i>	0,10%	0,50%	0,25%
<i>P. nigrum</i> (b)	-	0,50%	-
<i>P. nigrum</i> (p)	-	-	-
<i>S. terebinthifolius</i>	-	0,25%	0,25%
<i>C. baccatum</i>	-	-	-
<i>C. chinense</i> (bq)	-	-	-
<i>C. chinense</i> (b)	-	-	1,00%
<i>C. frutescens</i>	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2015

Através do método de microdiluição em caldo, os melhores resultados dos óleos essenciais obtidos por Clevenger contra cada fungo estudado, de acordo com as CMIs obtidas: *Aspergillus niger* – *Pimenta dioica* (25%), *Candida albicans* – *Pimenta dioica* e *Schinus terebinthifolius* (25% em ambas), *Penicillium sp.* – *Pimenta dioica* e *Schinus terebinthifolius* (25% em ambas). Através do método de microdiluição em caldo, os melhores resultados das oleoresinas obtidas por Soxhlet contra cada fungo estudado, de acordo com as CMIs obtidas: *Aspergillus niger* – *Pimenta dioica* (10%), *Candida albicans* – *Schinus terebinthifolius* (25%), *Penicillium sp.* – *Pimenta dioica* e *Schinus terebinthifolius* (25% em ambas).

Com relação à CMI dos óleos essenciais e oleoresinas das pimentas estudadas frente aos três fungos avaliados, observa-se que *P. dioica*, *P. nigrum* (b) e *S. terebinthifolius* apresentaram CMI relevantes. Ainda assim, os óleos essenciais e oleoresinas de *P. dioica* contra todos os fungos e de *S. terebinthifolius* contra *C. albicans* e *Penicillium sp.* foram as mais expressivas.

Considerando o método de microdiluição em caldo, no qual foi avaliada a atividade antibacteriana das oleoresinas e óleos essenciais obtidos pelos métodos de Soxhlet e Clevenger e a concentração mínima inibitória (CMI), os resultados observados foram dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos essenciais/oleoresinas para as bactérias estudadas

Óleos essenciais extraídos pelo método Clevenger			
Pimenta	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. dioica</i>	0,10%	0,50%	1,00%
<i>P. nigrum</i> (b)	0,25%	-	1,00%
<i>P. nigrum</i> (p)	0,25%	1,00%	0,50%
<i>S. terebinthifolius</i>	0,10%	0,25%	0,50%
<i>C. baccatum</i>	0,25%	-	-
<i>C. chinense</i> (bq)	0,25%	-	-
<i>C. chinense</i> (b)	0,25%	-	-
<i>C. frutescens</i>	0,50%	-	-
Oleoresinas extraídas pelo método Soxhlet			
Pimenta	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. dioica</i>	0,25%	0,50%	0,25%
<i>P. nigrum</i> (b)	0,10%	-	-
<i>P. nigrum</i> (p)	1,00%	-	-
<i>S. terebinthifolius</i>	0,10%	0,10%	0,25%
<i>C. baccatum</i>	0,25%	-	-
<i>C. chinense</i> (bq)	1,00%	-	-
<i>C. chinense</i> (b)	0,25%	-	-
<i>C. frutescens</i>	0,25%	-	-

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2015

Através do método de microdiluição em caldo, os melhores resultados dos óleos essenciais obtidos por Clevenger contra cada bactéria estudada, de acordo com as CMIs obtidas: *Bacillus cereus* – *Pimenta dioica* e *Schinus terebinthifolius* (10% em ambas), *Escherichia coli* – *Schinus terebinthifolius* (25%), *Staphylococcus aureus* – *Piper nigrum* (p) e *Schinus terebinthifolius* (50% em ambas). Através do método de microdiluição em caldo, os melhores resultados das oleoresinas obtidas por Soxhlet contra cada fungo estudado, de acordo com as CMIs obtidas: *Bacillus cereus* – *Piper nigrum* (b) e *Schinus terebinthifolius* (10% em ambas), *Escherichia coli* – *Schinus terebinthifolius* (10%), *Staphylococcus aureus* – *Pimenta dioica* e *Schinus terebinthifolius* (25% em ambas).

Já a CMI dos óleos essenciais e oleoresinas das pimentas estudadas frente às três bactérias avaliadas, foram observados bons resultados frente à *B. cereus*, com exceção das oleoresinas de *P. nigrum* (p) e *C. chinense* (bq). Entretanto, apenas as oleoresinas e óleos essenciais de *P. dioica* e *S. terebinthifolius* mostraram resultados relevantes frente a todas as bactérias.

Comparando-se os dois métodos de bioensaios utilizados, ficou clara a praticidade da técnica de microdiluição em caldo realizada em microplacas, quando se fazem necessárias grandes volumes de análises e muitas amostras. Traduzindo-se em números, há ganho de tempo, de trabalho em laboratório, além do menor impacto ambiental.

Quando se comparam os dois métodos de extração empregados, verifica-se que o método Clevenger é, sem dúvida, o melhor método para a extração de óleos essenciais, principalmente para a aplicação biotecnológica. Isso porque, apesar de apresentar um baixo rendimento percentual a pureza do material obtido é muito maior e, portanto, fundamental para a aplicação em bioprocessos que exijam materiais de partida puros. Tal observação pode ser verificada inclusive pela coloração do mesmo.

Além disso, levando-se em conta custos e impactos ambientais, esse também é o melhor método, uma vez que a extração é realizada com água ao invés de solvente orgânico, como acontece no método Soxhlet.

Entretanto, as oleoresinas obtidas pelo método Soxhlet, também podem ser utilizadas em processos que não exijam pureza do material de partida.

5.3 ANÁLISES POR CG-EM

Por meio de análises realizadas por CG-EM, as quais foram realizadas em colaboração com a empresa Ourofino Agrociência, foi possível identificar os compostos que compõem os óleos essenciais de pimenta-rosa e de pimenta-da-Jamaica.

A Figura 29-A mostra o cromatograma obtido para a análise do óleo essencial de pimenta-rosa, a Figura 29-B mostra a expansão do cromatograma na região de 6-16min e a Figura 29-C mostra o espectro de Massas obtido para a análise do óleo essencial de pimenta-rosa.

Após análise do cromatograma da Figura 29 pode-se observar a presença de 8 compostos no óleo essencial de pimenta-rosa (Tabela 5). A identificação desses compostos foi realizada por comparação com espectros de Massas do National Institute of Standards and Technology (NIST) (STEIN, 2015).

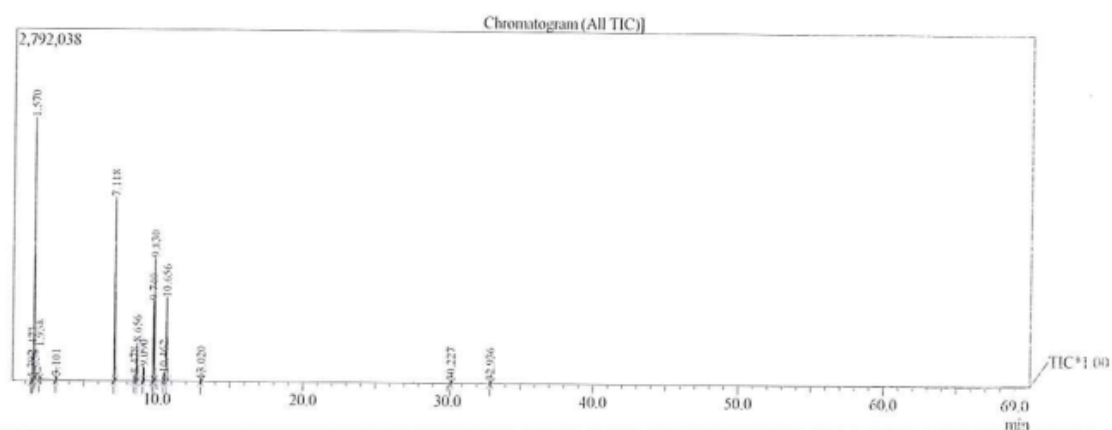
Tabela 5 – Compostos identificados em óleo essencial de pimenta-rosa (*S. terebinthifolius*), por CG-EM

Composto	Pico	Tempo (min)	Peso molecular
α -pineno	1.º	7,12	136
α -felandreno	2.º	8,48	136
β -pineno	3.º	8,66	136
β -mirceno	4.º	9,09	136
trans-3-careen-2-ol	5.º	9,74	152
1-R- α -pireno	6.º	9,83	136
o-cimeno	7.º	10,46	134
(-)-limoneno	8.º	10,66	136

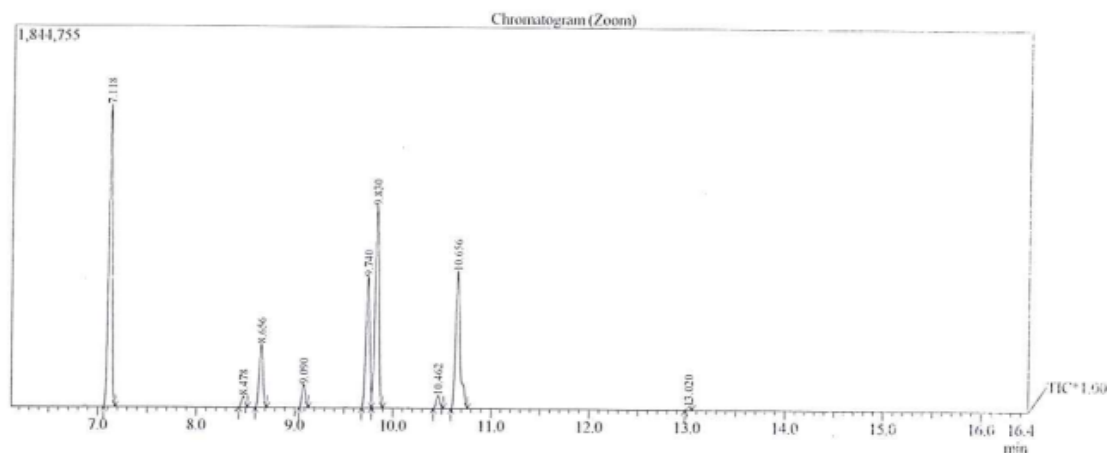
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2015

Figura 29 – Cromatogramas e Espectro de Massas da análise do óleo essencial de pimenta-rosa (*S. terebinthifolius*) por CG-EM

A - Cromatograma total



B - Expansão do Cromatograma na região entre 6-16 min.



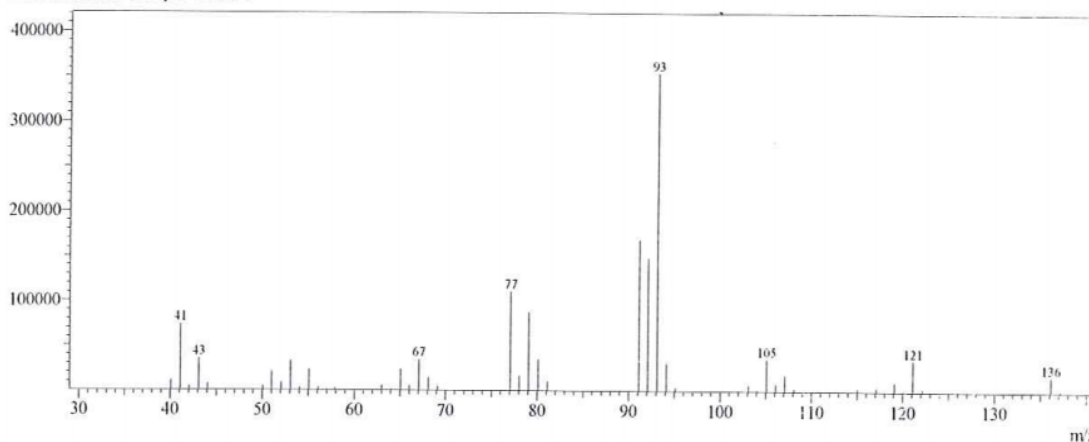
C - Espectro de Massas

Line#:1 R.Time:7.120(Scan#:937)

MassPeaks:50

RawMode:Single 7.120(937) BasePeak:93.10(354268)

BG Mode:None Group 1 - Event 1

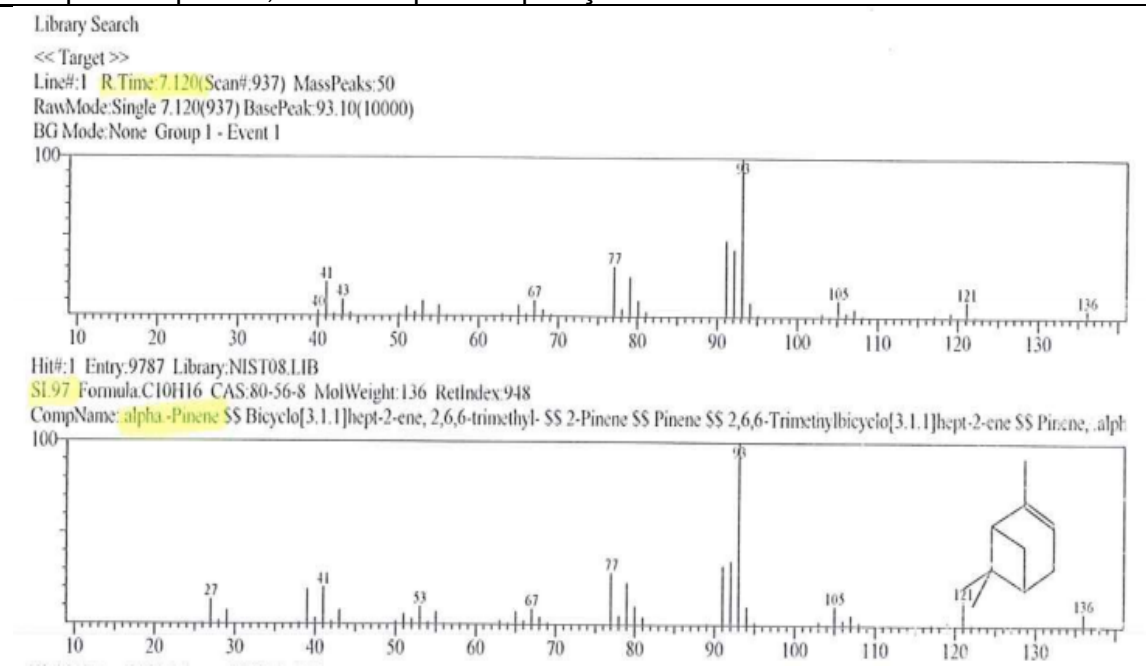


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 30 apresenta o espectro de Massas do pico em 7,12 min (1.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do α -pineno, cuja estrutura encontra-se na Figura 30.

Figura 30 – Espectro de Massas do pico em 7,12 min (1.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto α -pineno, realizada por comparação com o NIST

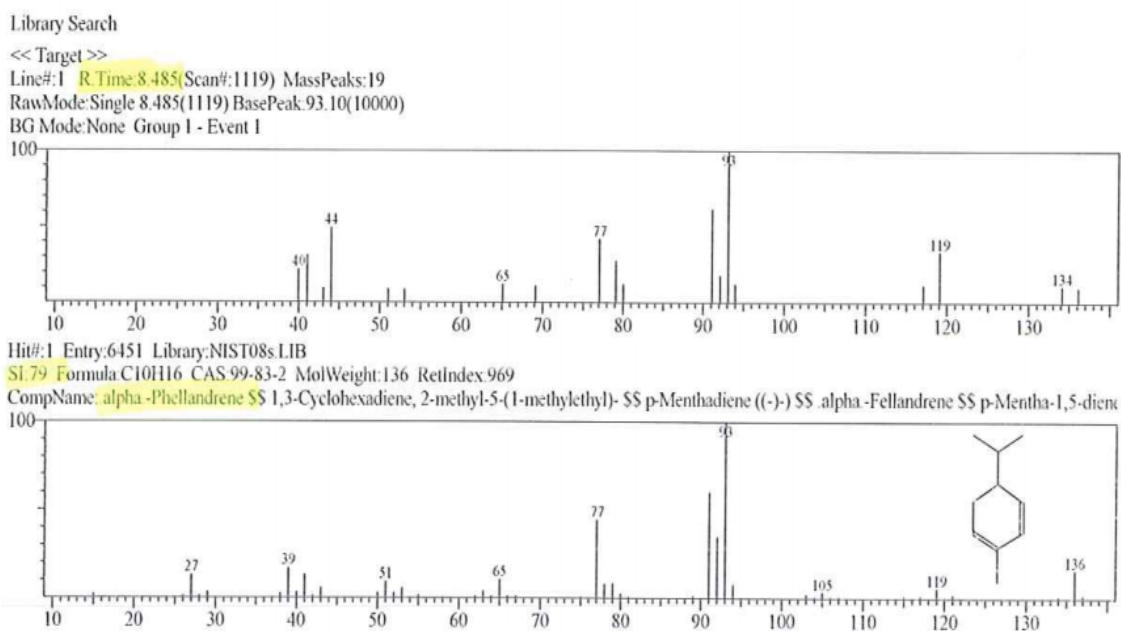


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 31 apresenta o espectro de Massas do pico em 8,48 min (2.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do α -felandreno, cuja estrutura encontra-se na Figura 31.

Figura 31 – Espectro de Massas do pico em 8,48 min (2.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto α -felandreno, realizada por comparação com o NIST

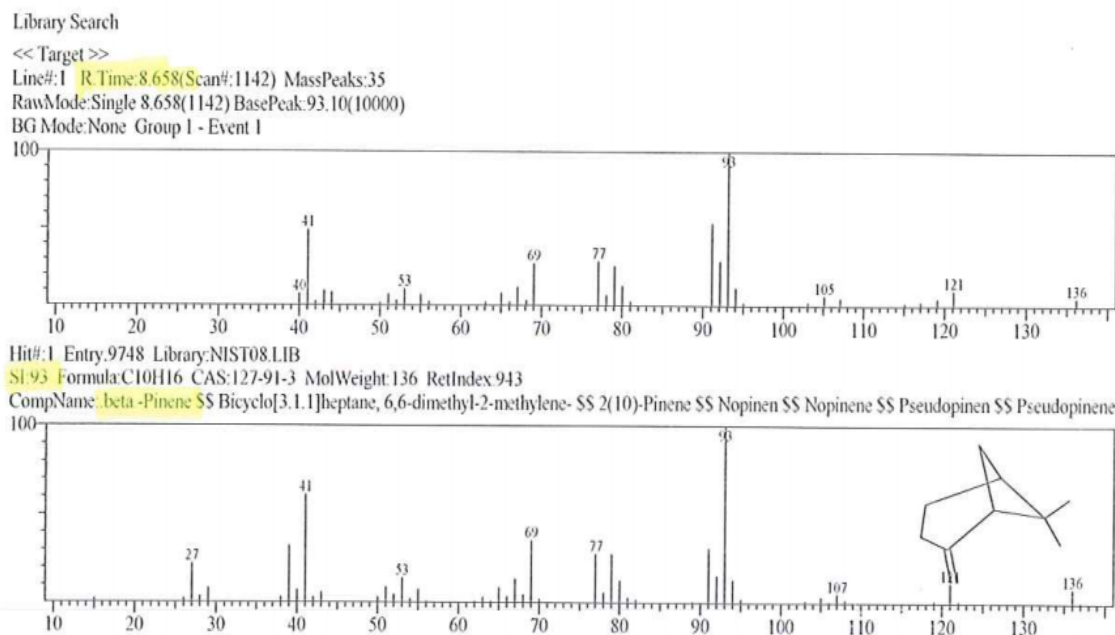


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 32 apresenta o espectro de Massas do pico em 8,66 min (3.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do β -pineno, cuja estrutura encontra-se na Figura 32.

Figura 32 – Espectro de Massas do pico em 8,66 min (3.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto β -pineno, realizada por comparação com o NIST

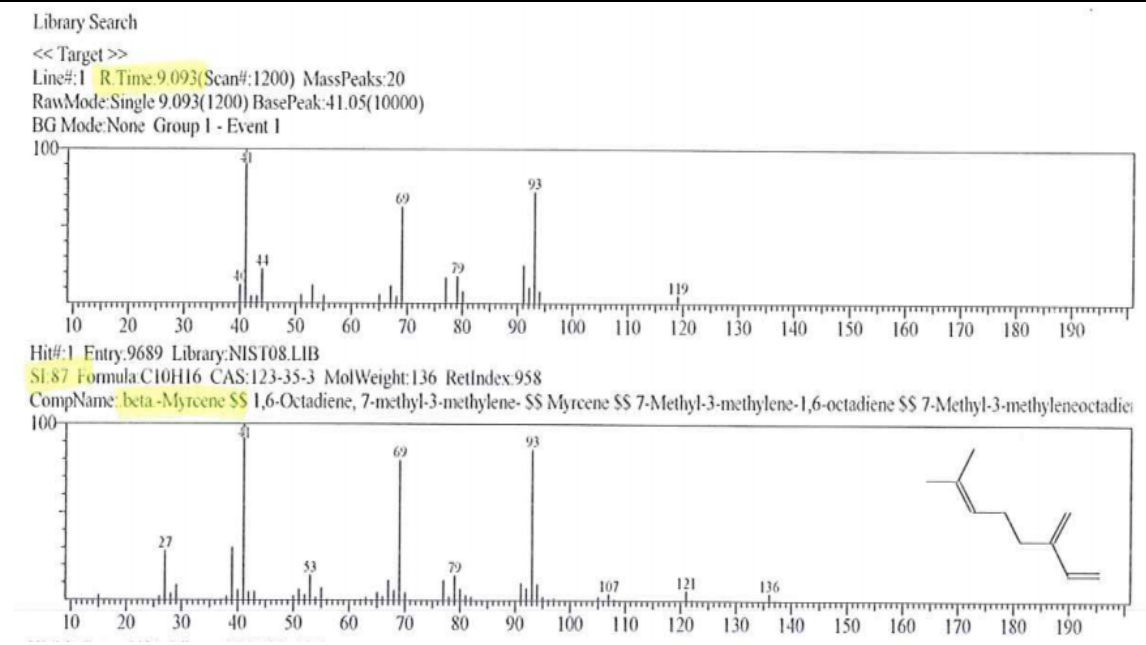


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 33 apresenta o espectro de Massas do pico em 9,09 min (4.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do β -mirceno, cuja estrutura encontra-se na Figura 33.

Figura 33 – Espectro de Massas do pico em 9,09 min (4.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto β -mirceno, realizada por comparação com o NIST

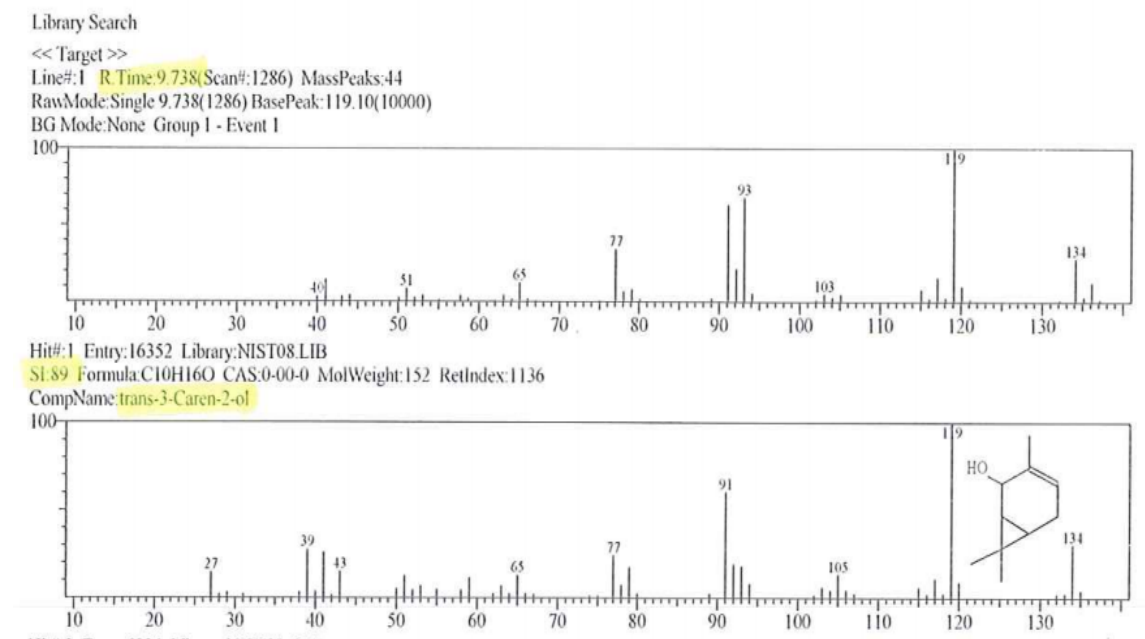


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 34 apresenta o espectro de Massas do pico em 9,74 min (5.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do trans-3-caren-2-ol, cuja estrutura encontra-se na Figura 34.

Figura 34 – Espectro de Massas do pico em 9,74 min (5.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto trans-3-caren-2-ol, realizada por comparação com o NIST

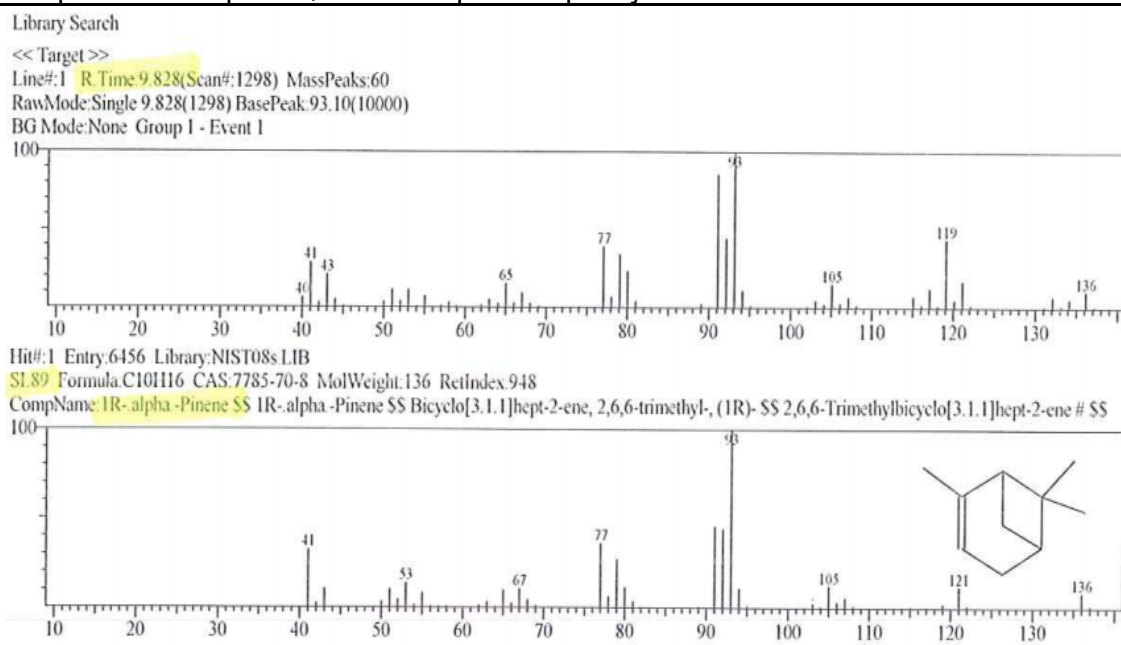


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 35 apresenta o espectro de Massas do pico em 9,83 min (6.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do 1-R- α -pireno, cuja estrutura encontra-se na Figura 35.

Figura 35 – Espectro de Massas do pico em 9,83 min (6.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto 1-R- α -pireno, realizada por comparação com o NIST

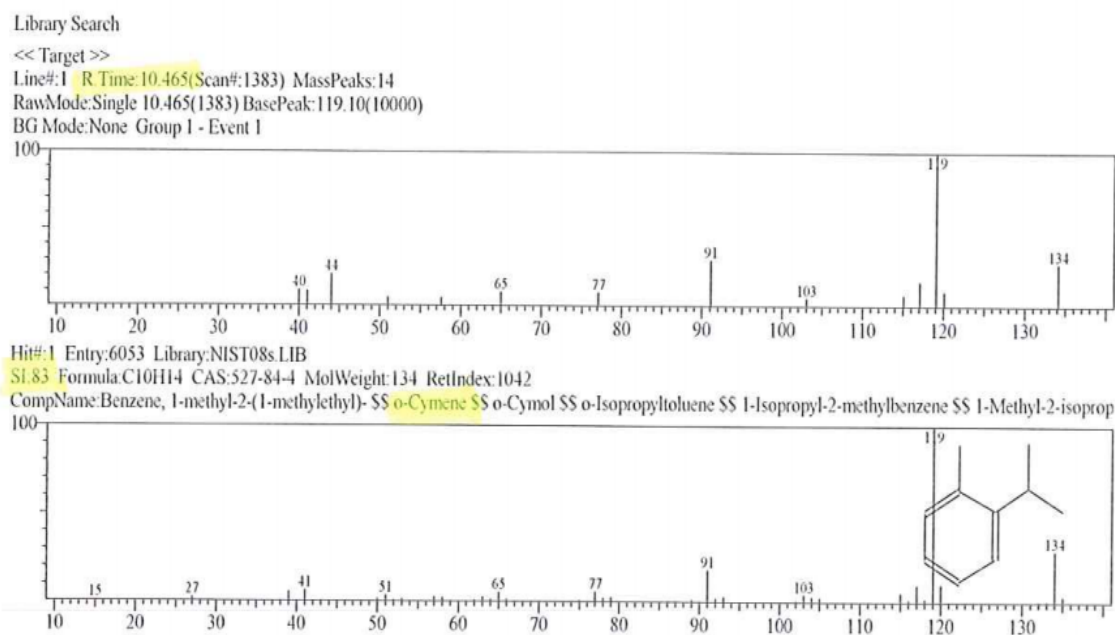


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 36 apresenta o espectro de Massas do pico em 10,46 min (7.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do o-cimeno, cuja estrutura encontra-se na Figura 36.

Figura 36 – Espectro de Massas do pico em 10,46 min (7.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto o-cimeno, realizada por comparação com o NIST

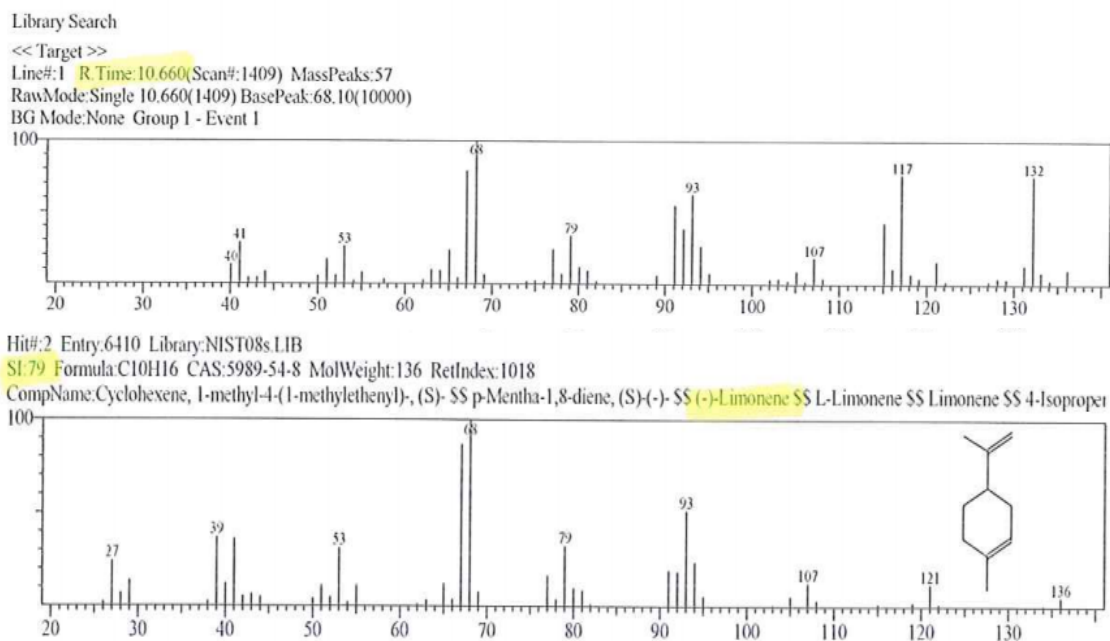


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 37 apresenta o espectro de Massas do pico em 10,66 min (8.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do (-)-limoneno, cuja estrutura encontra-se na Figura 37.

Figura 37 – Espectro de Massas do pico em 10,66 min (8.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-rosa e a identificação do composto (-)-limoneno, realizada por comparação com o NIST



Fonte: Do Autor, 2015

Martins et al. (2014) extraíram o óleo essencial de uma espécie de pimenta-rosa, avaliaram o mesmo através de CG-EM e avaliaram tanto a atividade antioxidante quanto a atividade antimicrobiana desse óleo. Os autores identificaram 16 componentes no óleo essencial extraído. Entretanto, os compostos principais foram α - e β -felandreno, β -mirceno, limoneno e α -pineno, mesmos compostos identificados no óleo essencial extraído de pimenta rosa no presente trabalho.

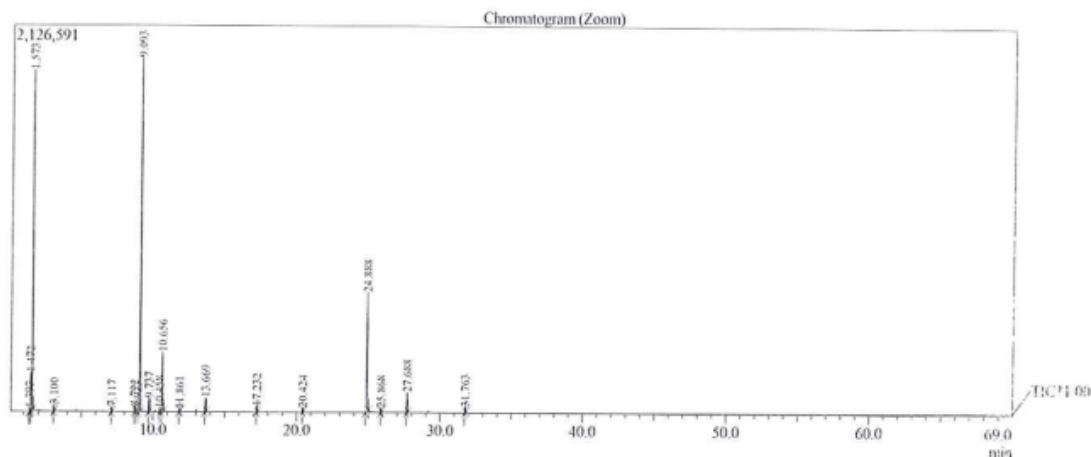
Provavelmente, a sazonalidade é um fator importante para a diferenciação da presença de compostos nos óleos essenciais de forma geral. Trabalhos futuros serão realizados para verificar-se a composição do óleo essencial de pimenta-rosa para comprovar-se tal hipótese.

O óleo essencial extraído por Martins et al. (2014), apresentou atividade antioxidante significativa e propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram + e Gram -, além de fungos comumente encontrados na deterioração de alimentos. Os autores sugerem ainda que o óleo essencial de pimenta-rosa tem potencial para uso em biotecnologia, alimentos e / ou indústria farmacêutica.

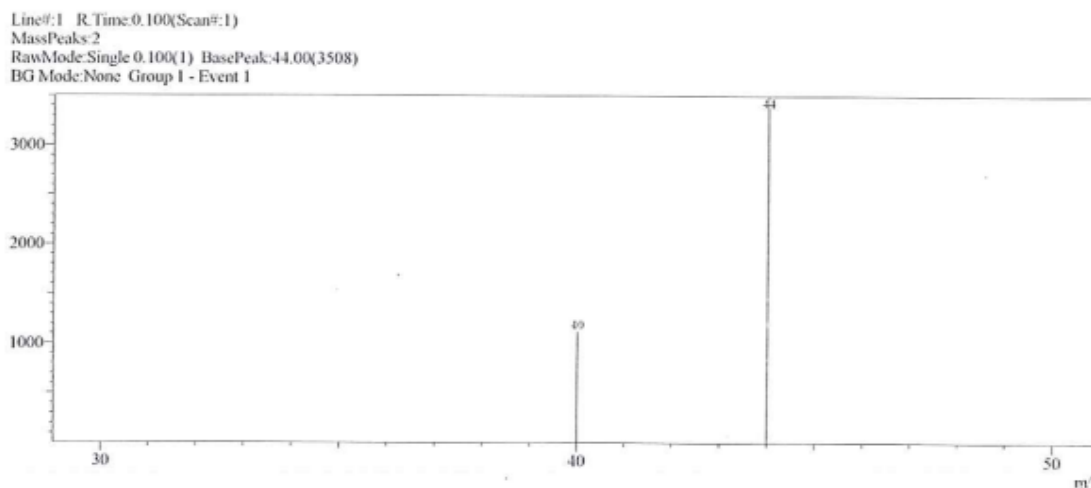
A Figura 38-A mostra o cromatograma obtido para a análise do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica, a Figura 38-B mostra o espectro de Massas obtido para a análise do óleo essencial de pimenta-rosa.

Figura 38 – Cromatogramas e Espectro de Massas da análise do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (*P. dioica*) por CG-EM

A - Cromatograma total



B - Espectro de Massas



Fonte: Do Autor, 2015

Após análise do cromatograma da Figura 38 pode-se observar a presença de 8 compostos no óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (Tabela 6). A identificação desses compostos foi realizada pelo método de comparação com espectros de Massas do NIST (STEIN, 2015).

Tabela 6 – Compostos identificados em óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (*P. dioica*), por CG-EM

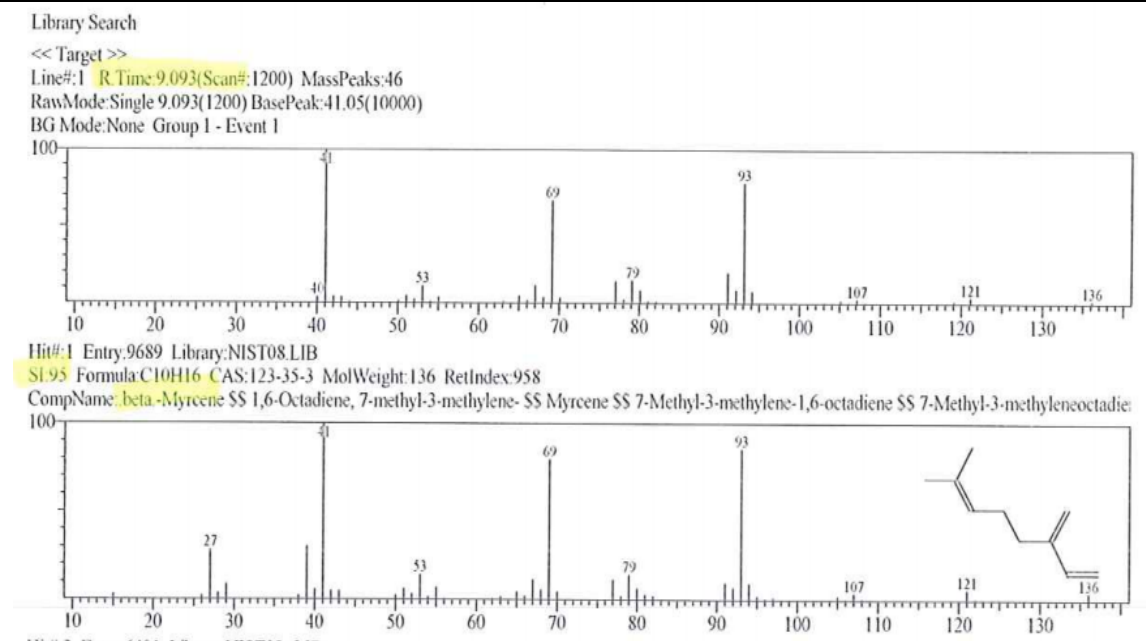
Composto	Pico	Tempo (min)	Peso molecular
β -mirceno	1.º	9,09	136
α -felandreno	2.º	9,74	136
1-pentanona	3.º	10,46	176
(-)-limoneno	4.º	10,65	136
-pineno	5.º	13,67	136
γ -terpineno	6.º	17,24	136
p-eugenol	7.º	24,89	164
biciclo [7,2,0]-undec-4-eno-4,11,11-trimetil-8-metileno	8.º	24,89	204

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2015

A Figura 39 apresenta o espectro de Massas do pico em 9,09 min (1.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do β -mirceno, cuja estrutura encontra-se na Figura 39.

Figura 39 – Espectro de Massas do pico em 9,09 min (1.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto β -mirceno, realizada por comparação com o NIST

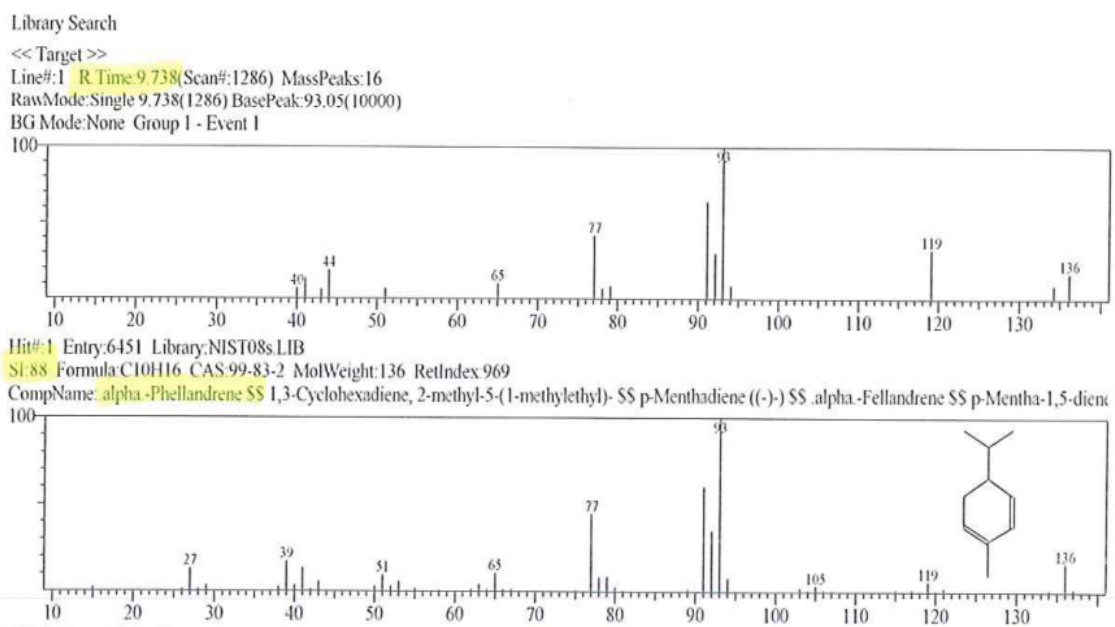


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 40 apresenta o espectro de Massas do pico em 9,74 min (2.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do α -felandreno, cuja estrutura encontra-se na Figura 40.

Figura 40 – Espectro de Massas do pico em 9,74 min (2.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto α -felandreno, realizada por comparação com o NIST

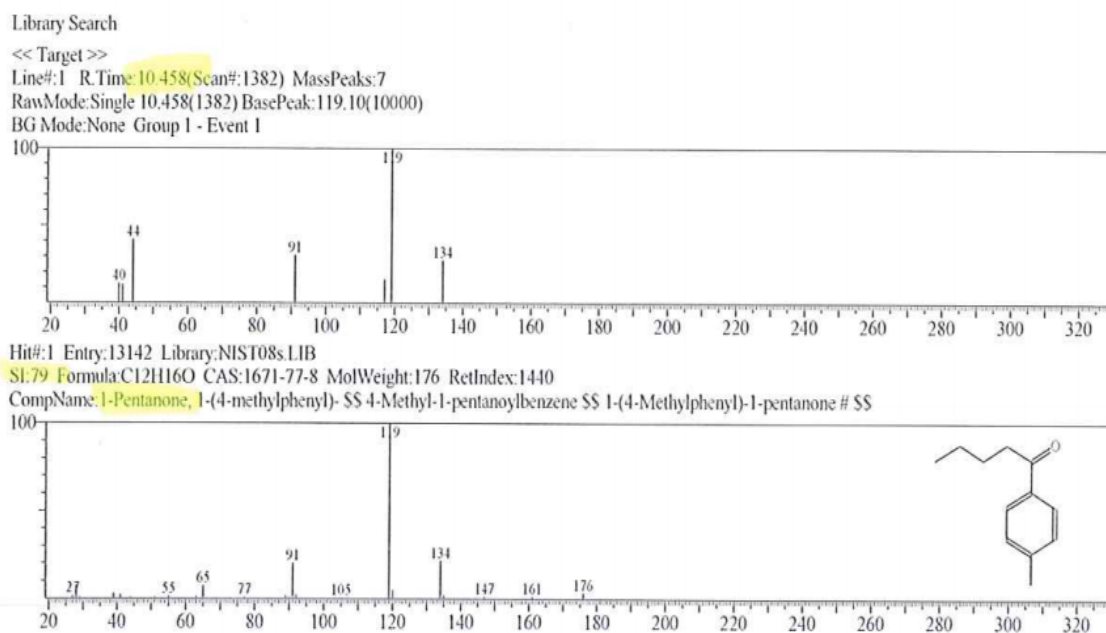


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 41 apresenta o espectro de Massas do pico em 10,46 min (3.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do 1-pentanona, cuja estrutura encontra-se na Figura 41.

Figura 41 – Espectro de Massas do pico em 10,46 min (3.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto 1-pentanona, realizada por comparação com o NIST

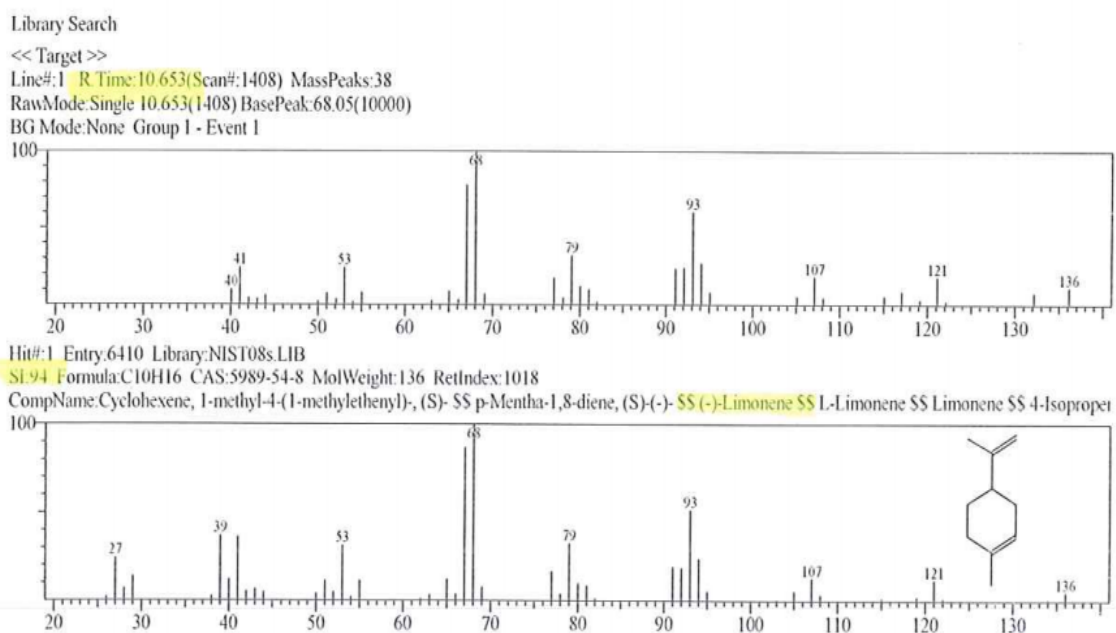


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 42 apresenta o espectro de Massas do pico em 10,65 min (4.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do (-)-limoneno, cuja estrutura encontra-se na Figura 42.

Figura 42 – Espectro de Massas do pico em 10,65 min (4.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto (-)-limoneno, realizada por comparação com o NIST

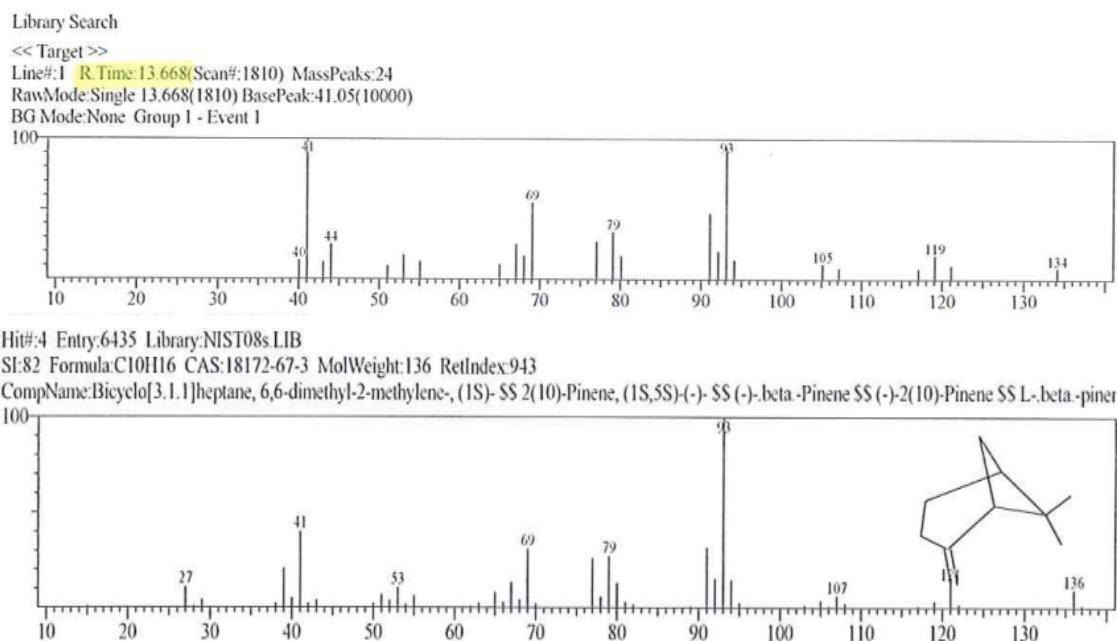


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 43 apresenta o espectro de Massas do pico em 13,67 min (5.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do β -pineno, cuja estrutura encontra-se na Figura 43.

Figura 43 – Espectro de Massas do pico em 13,67 min (5.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto β -pineno, realizada por comparação com o NIST

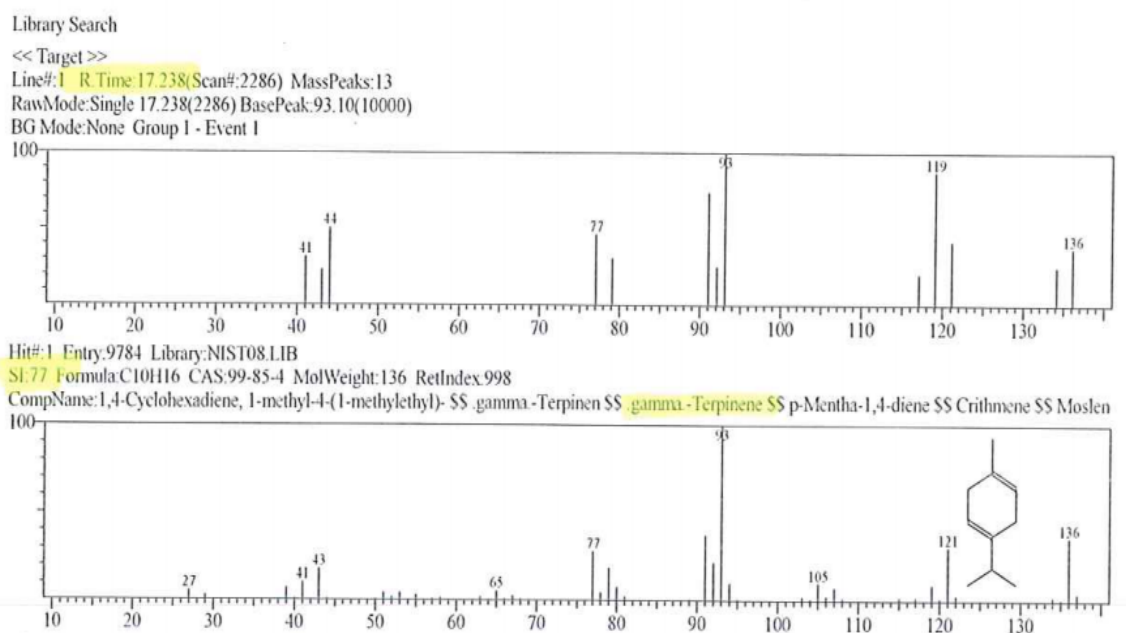


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 44 apresenta o espectro de Massas do pico em 17,24 min (6.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do γ -terpineno, cuja estrutura encontra-se na Figura 44.

Figura 44 – Espectro de Massas do pico em 17,24 min (6.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto γ -terpineno, realizada por comparação com o NIST

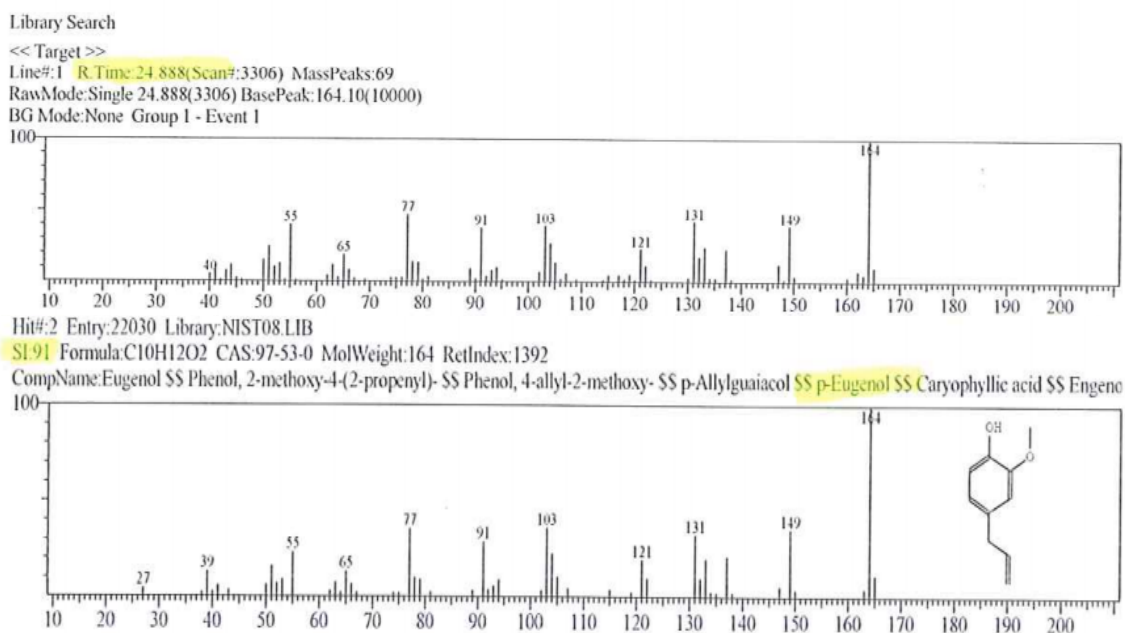


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 45 apresenta o espectro de Massas do pico em 24,89 min (7.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do p-eugenol, cuja estrutura encontra-se na Figura 45.

Figura 45 – Espectro de Massas do pico em 24,89 min (7.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto p-eugenol, realizada por comparação com o NIST

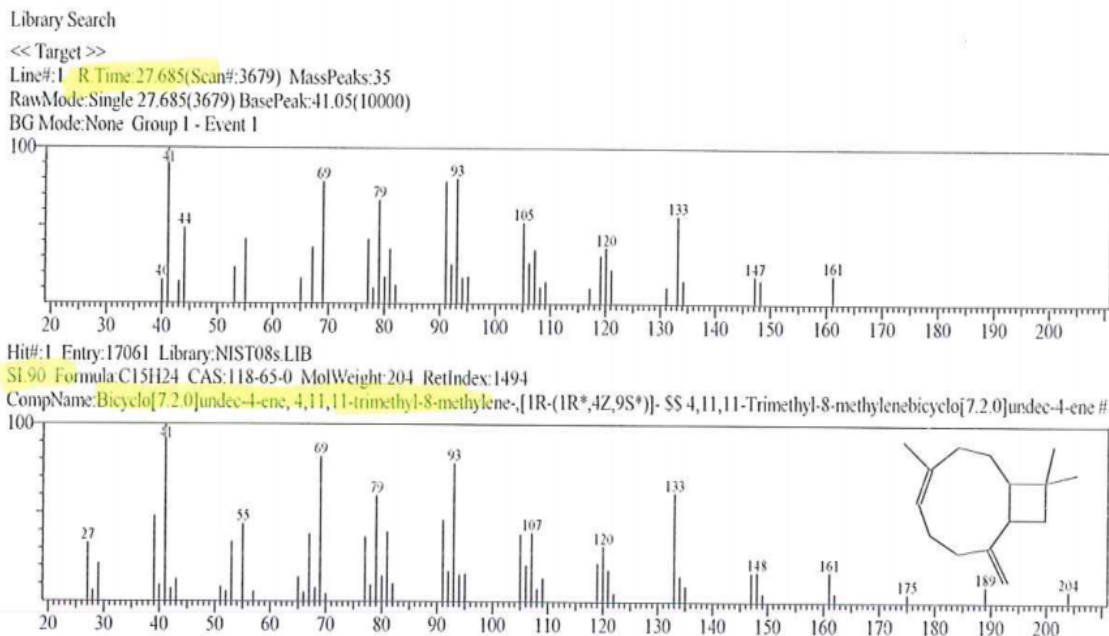


Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 46 apresenta o espectro de Massas do pico em 27,68 min (8.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto através de comparação com o NIST.

Através da análise por CG-EM desse pico identificou-se a presença do biciclo [7,2,0]-undec-4-eno-4,11,11-trimetil-8-metileno, cuja estrutura encontra-se na Figura 46.

Figura 46 – Espectro de Massas do pico em 24,89 min (8.º pico) obtido no cromatograma de separação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica e a identificação do composto biciclo [7,2,0]-undec-4-eno-4,11,11-trimetil-8-metileno, realizada por comparação com o NIST



Fonte: Do Autor, 2015

Segundo Rao et al. (2012), os principais constituintes do óleo essencial dos frutos de *Pimenta dioica* são: limoneno, 1,8 cineola, terpinoleno, β -cariofilleno, β -selineno e metil eugenol. Já os constituintes do óleo essencial das folhas de *Pimenta dioica* são: eugenol, metil eugenol, β -cariofilleno e mirceno.

No presente trabalho também foram obtidos alguns daqueles compostos obtidos de forma semelhante por Rao et al. (2012), porém a composição do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*) estudada no presente trabalho, ainda inclui outros compostos. Muito provavelmente, além da sazonalidade, o local também influi na composição do óleo essencial das plantas, como por exemplo, a composição do solo, clima, etc.

Ainda de acordo com Rao e colaboradores (2012), o óleo essencial de *P. dioica* apresenta um amplo espectro de atividade biológica, incluindo: atividade anticancerígena, atividade antifúngica, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante e ainda apresenta efeito antidiabético.

Jiang et al. (2013), também obtiveram uma composição diferente do óleo essencial de *P. dioica* da obtida no presente trabalho. Os autores obtiveram 24 compostos na análise por CG do óleo essencial isolado e desses apenas o eugenol e o terpineno foram comum aos compostos encontrados no presente trabalho.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

A Tabela 7 traz, resumidamente, os resultados do teste ANOVA realizado com os dados de extração de *Pimenta dioica*, *Piper nigrum* (branca), *Piper nigrum* (preta) e *S. terebinthifolius*.

Tabela 7 – Quadro de ANOVA (*two way*)

Fator de Variação	GL	SQ	QM	p
Media	1	1009.59	1009.59	0.000000
Método	1	246.27	246.27	0.000000
Pimenta	3	73.69	24.56	0.000127
Método*Pimenta	3	47.04	15.68	0.001302
Resíduos	16	29.42	1.84	
Total	23	369.42		

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2015

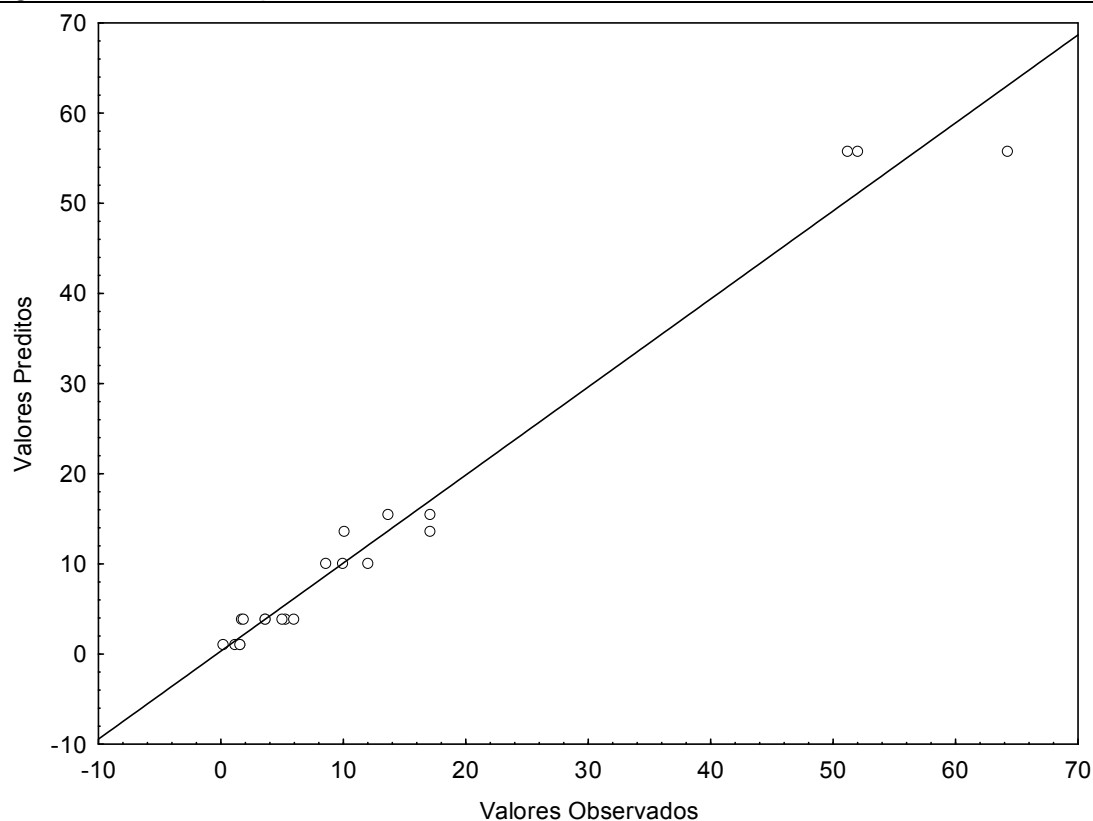
De acordo com a Tabela 7, onde foram apresentadas as somas dos quadrados, seus graus de liberdade, variância do quadrado médio e a estatística p ., considerando um nível de significância de 5% ($p=0,05$), observa-se que para a variável pimenta $p < 0,05$ dentro da região de rejeição de H_0 . Portanto, os tipos de pimentas são estatisticamente diferentes, ou seja, ocorre efeito desta variável sobre o rendimento da extração.

Ainda olhando a Tabela 7, nota-se que a variável tipo de método de extração influencia a variável resposta ($p < 0,05$, dentro da região de rejeição de H_0), sendo as duas metodologias estatisticamente diferentes.

Pensando no efeito de interação entre as variáveis pimenta e metodologia de extração, observa-se na Tabela 7 que o valor de $p < 0,05$ (também dentro da região de rejeição de H_0) denota que a interação entre estas variáveis tem interferência sobre a resposta.

Observa-se na Figura 47 que o gráfico apresenta boa distribuição dos valores em torno da reta identidade, evidenciando que o modelo possui boa qualidade para o ajuste aos dados.

Figura 47 – Valores preditos x Valores observados

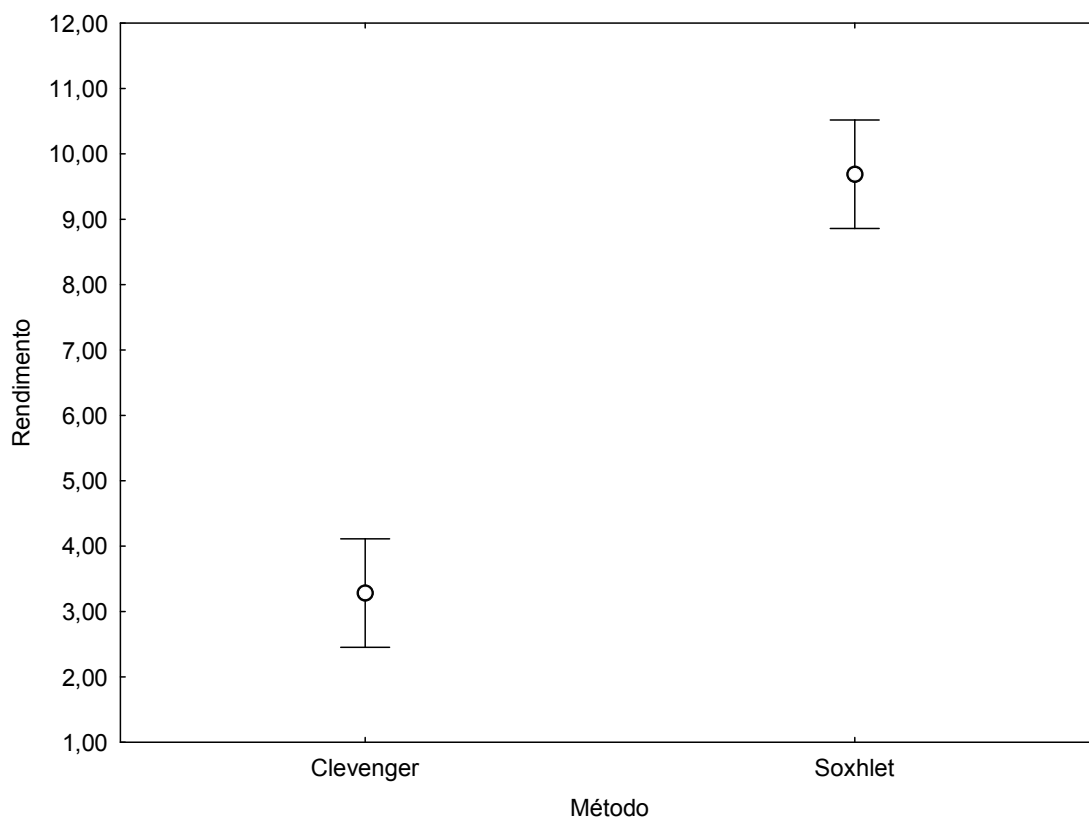


Fonte: Do Autor, 2015

De acordo com o quadro de ANOVA, pode-se afirmar que o rendimento é função do tipo de metodologia de extração, do tipo de pimenta e da interação entre pimenta e tipo de extração, pois estas foram as variáveis que estatisticamente influenciaram. Isto pode ser comprovado pelos baixos valores de p obtidos para a contabilização destes efeitos.

Na Figura 48 estão apresentados os rendimentos em função das metodologias de extração empregadas. Esta sugere que a metodologia Soxhlet possui maior rendimento que a metodologia Clevenger para todos os tipos de pimentas empregados nessa análise estatística.

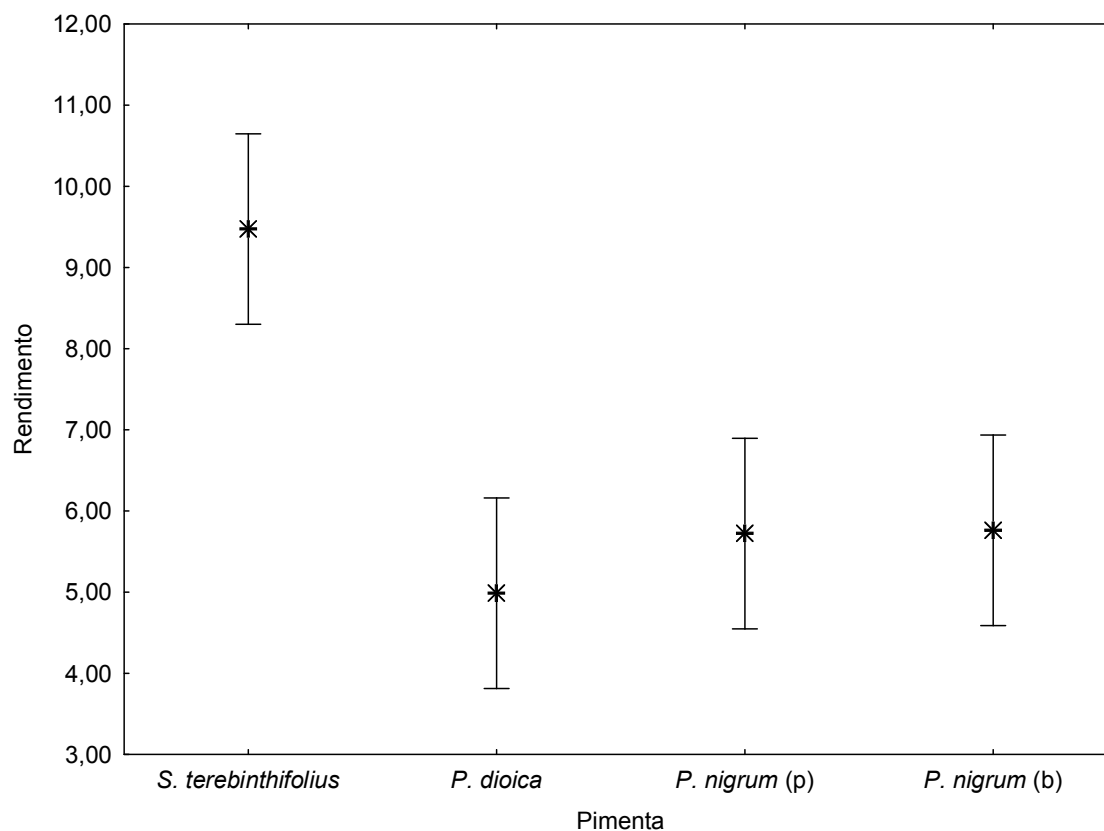
Figura 48 – Efeito da variável “método de extração”



Fonte: Do Autor, 2015

A Figura 49 traz os rendimentos em função do tipo de pimenta empregado. Esta figura evidencia que os maiores rendimentos foram obtidos para as extrações em que fora empregada a pimenta *S. terebinthifolius*. Outrossim, suspeita-se que, estatisticamente, as pimentas *P. dioica* e *Piper nigrum* (preta e branca) possuem efeitos parecidos sobre o rendimento de extração.

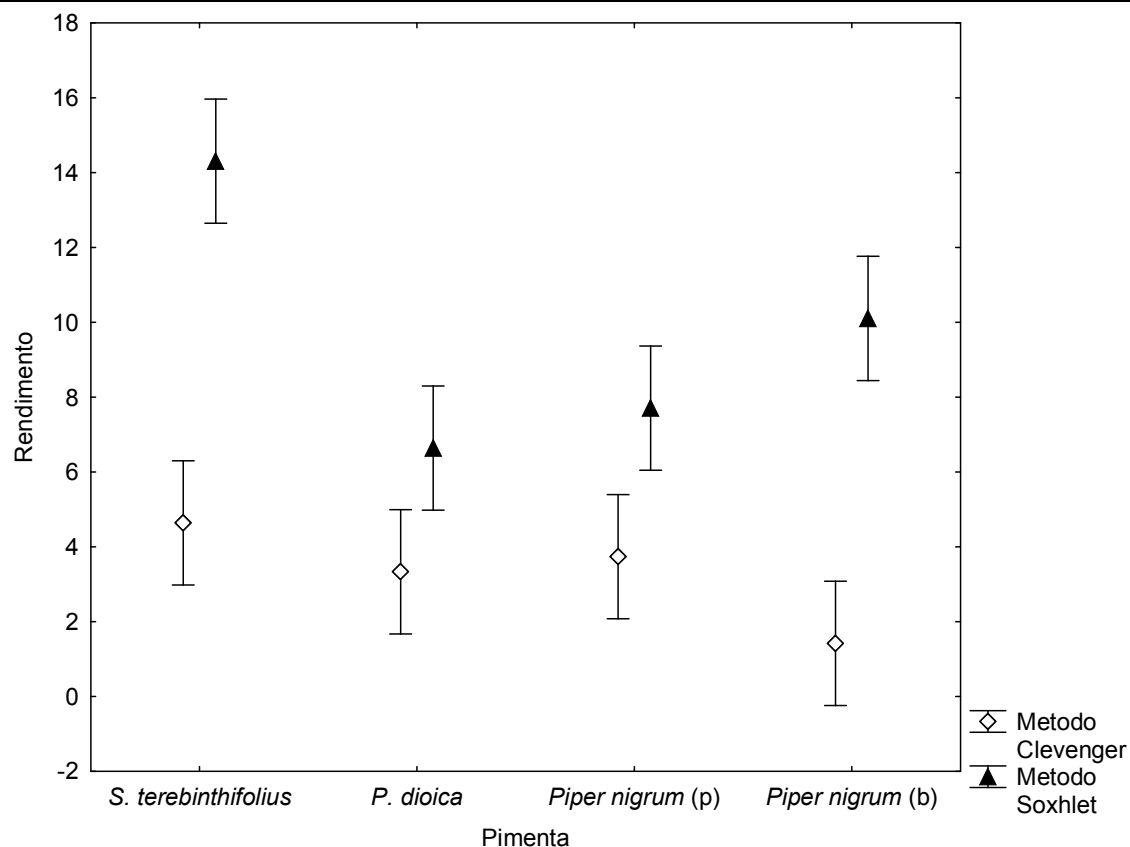
Figura 49 – Efeito da variável “tipo de pimenta”



Fonte: Do Autor, 2015

Na Figura 50 estão apresentados os rendimentos em função da interação entre as metodologias de extração empregadas e os tipos de pimentas. A figura afirma que a metodologia Soxhlet associada à pimenta *S. terebinthifolius* corresponde aos maiores rendimentos obtidos.

Figura 50 – Efeito da Interação entre as variáveis: Tipo de Método*Tipo de Pimenta



Fonte: Do Autor, 2015

6 CONCLUSÃO

A partir do trabalho realizado pode-se concluir:

- Em relação às extrações, conclui-se que no método Clevenger obtém-se menores rendimentos percentuais, porém os óleos essenciais são visivelmente livres de pigmentos e, portanto mais puros e com melhor valor para aplicação biotecnológica;
- Em relação aos bioensaios de atividade antimicrobiana e antifúngica, bem como de CMI conclui-se que as oleoresinas e óleos essenciais de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*) e a pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*), foram as que se apresentam mais promissoras.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C.; ARAÚJO, S. M. B.; BAENA, A. R. C.; BASTOS, T. X.; CELESTINO FILHO, P.; CHU, E. Y.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; DUARTE, M. L. R.; FERREIRA, C. A. P.; HIDAKA, G. S.; HOMMA, A. K. O.; ISHIZUKA, Y.; KATO, A. K.; KONAGANO, M.; LEMOS, W. P.; MASCARENHAS, R. E. B.; OKAJIMA, H.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, T. E. Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino. **Embrapa Amazônia Oriental**, Brasília, dez. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>>. Acesso em: 18 mai. 2015.
- ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A. B.; JOSÉ, K. F. D. **Plantas medicinais de uso popular**. Atlas farmacognóstico. Canoas: ULBRA, 1995. 205 p.
- ALLEN-GENTRY, C. New paper towels harbor toxic bacteria. **Nurse Courtney**, Oakland, 14 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.nursecourtney.com/2012/08/14/new-paper-towels-harbor-toxic-bacteria/>>. Acesso em: 27 abr. 2015.
- ALVES, R. **Pimentas**: Para provocar um incêndio não é preciso fogo. 2. ed. São Paulo: Planeta, 2014. 215 p.
- ANSARI, M. I. Peppers. **Cuisine of Karachi**, Karachi, 11 abr. 2015. Disponível em: <<http://miansari66.blogspot.com.br/2015/04/peppers.html>>. Acesso em: 12 abr. 2015.
- BALBACH, A.; BOARIM, D. S. F. **As hortaliças na medicina natural**. 2. ed. São Paulo: Missionária, 1992. 291 p.
- BAUMEL, O. Pilão. **Oba Gastronomia**, [S.l.], 22 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.obagastronomia.com.br/pilao-e-mignonette/>>. Acesso em: 15 nov. 2014.
- BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of food science**: Malden, MA, v. 75, n. 6, p. 446-472, 2010.
- BIBLIOTHEQUE NATIONALE DE FRANCE. Le poivre. **Livre des merveilles et autres récits de voyages et de textes sur l'Orient**, Paris, 31 jan. 2012. Disponível em: <<http://expositions.bnf.fr/gastro/grands/076.htm>>. Acesso em: 26 mai. 2015.
- BURNIE, D. **Dicionário temático de biologia**. São Paulo: Scipione, 1997. 222 p.
- CARVALHO, W. **Biologia em foco**. São Paulo: FTD, 2002. 367 p.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *E. coli*. **General Information**, Atlanta, 7 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/>>. Acesso em: 27 abr. 2015.

CHAVES, G. B.; SANTOS, M. S.; CAJUEIRO, S. D. Avaliação do nível de conhecimento de discentes dos cursos superiores de saúde a respeito da candidíase vaginal. **Revista Saúde e Ciência Online**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 90-104, 2015.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; FARIA, R. O.; XAVIER, M. O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P. S.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1291-1294, 2010.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1995. 279 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006, 250 p.

CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J.; DONATE, P. M. **Fundamentos da química experimental**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004. 280 p.

CORREA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. **Plantas medicinais**: Do cultivo a terapêutica. 8. ed. São Paulo: Vozes, 2011. 272 p.

COSTA, M. A.; DIAS, A. G.; GUIMARÃES, P. I. C. **Guia prático de química orgânica** – Volume I: Técnicas e procedimentos: aprendendo a fazer. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. 127 p.

COUTO, E. M. P.; CARLOS, D.; MACHADO, E. R. Candidíase em neonatos: Uma revisão epidemiológica. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Valinhos, v. 15, n. 4, p. 197-213, 2011.

CRUZ, P. O império português do século XV a XIX. **Marinha de Guerra Portuguesa**. Lisboa, 1.º ago. 2015. Disponível em: <<http://marinhadeguerraportuguesa.blogspot.com/>>. Acesso em 2 ago. 2015.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. 2 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2009. 670 p.

DALBY, A. **Dangerous tastes**: The story of spices. Oakland: UC Press, 2002. 184 p.

DEWITT, D. **The Chile pepper encyclopedia**: Everything you'll ever need to know about hot peppers, with more than 100 recipes. Darby, PA: Diane Publishing, 2003. 338 p.

DEWITT, D.; BOSLAND, P. W. **Peppers of the world**: An identification guide. Berkeley: Ten Speed, 1997. 219 p.

DI STASI, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; MARIOT, A.; SANTOS, C. M. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

DOMENICO, C. I.; COUTINHO, J. P.; GODOY, H. T.; MELO A. M. T. Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. **Horticultura brasileira**: Brasília, v. 30, n. 3, p. 466-472, 2012.

EUZÉBY, J. P. All names cited in the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Introduction. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature**, [S.I.], 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnames.html>>. Acesso em 14 ago. 2015.

FERNANDES, A. P. **Preparo de amostras**. Salvador: [s.n.], 201-?. Apostila elaborada pela professora Andréa Pires Fernandes, para o Grupo de Pesquisa em Química Analítica do Instituto de Química – Universidade Federal da Bahia.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 131 p.

FILIPPIS, F. M. **Extração com CO₂ supercrítico de óleos essenciais de hon-shoe ho-sho – experimentos e modelagem**. 2001. 102 F. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

FOGAÇA, J. R. V. Destilação simples. **Alunos Online**, Aparecida de Goiânia, [2013?]. Disponível em: <<http://www.alunosonline.com.br/quimica/destilacao-simples.html>>. Acesso em: 28 ago. 2013.

FOX, E. P.; BUI, C. K.; NETT, J. E.; HARTOONI, N.; MUI, M. C.; ANDES, D. R.; NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. **Molecular Microbiology**, [S.I.], v. 96, n. 6, p. 1226-1239, 2015.

GAHUNGU, A.; RUGANINTWALI, E.; KARANGWA, E.; ZHANG, X.; MUKUNZI, D. Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum chinense*) Scotch Bonnet variety at red stage. Reading, RCB: **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 211-218, 2011.

GOMES, P.; OLIVEIRA, M. A. **Análise química e estrutural**: Trabalhos práticos em química orgânica. Porto: Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, 2001. 383 p.

GRÉGIO, A. M. T.; FARIAS, M. M.; GOMES, M. C. B.; AZEVEDO, L. R.; LIMA, A. A. S.; MACHADO, M. Â. N. Capsaicina e sua aplicação em odontologia. **Arquivos em Odontologia**. Belo Horizonte, v.01, n. 44, p. 45-48, 2008.

GUIDOTTI, M. L'estrattore Soxhlet. **Tecniche estrattive**, [S.I.], [2004]. Disponível em: <http://www.galenotech.org/tecnica_est.htm>. Acesso em: 28 ago. 2013.

HOARE, J. **Guia completo de aromaterapia**. São Paulo: Pensamento, 2010. 195 p.

HORTO Botânico Paisagismo. Pimenta-dedo-de-moça. **Horto Botânico Paisagismo**, Batel, PR, [2014]. Disponível em: <<http://www.hortobotanico>>

paisagismo.com.br/area/produto.asp?intProId=110&des=Pimenta%20dedo%20de%20mo%E7a%20Pote%2011%A0Paisagismo%20e%20Jardinagem>. Acesso em: 10 de mai. 2015.

INDU, M. N.; HATHA, A. A. M.; ABIROSH, C.; HARSHA, U.; VIVEKANANDAN, G. Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 153-158, 2006.

JIANG, Z. T.; FENG, X.; LI, R.; WANG, Y. Composition comparison of essential oils extracted by classical hydro distillation and microwave-assisted hydrodistillation from *Pimenta dioica*, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 45-50, 2013.

KAPOOR, I. P. S.; SINGH, B.; SINGH, G.; DE HELUANI, C. S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*), **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, DC, v. 57, p. 5358–5364, 2009.

KIRK, P. Search in Index Fungorum. **Index Fungorum**, [S.l.], 201-?. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

KNAPP, E. Veja a tabela com o grau de ardência de algumas pimentas. **Uol Notícias: Saúde e alimentação**, São Paulo, 10 ago. 2012. Disponível em: <<http://noticias.uol.com.br/saude/album/2012/08/10/veja-a-tabela-com-o-grau-de-ardencia-de-algumas-pimentas.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

KRESS, H. *Pimenta dioica*. **Henriette's Herbal Homepage**, Helsinki, 8 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.henriettes-herb.com/galleries/photos/p/pi/pimenta-dioica-2.html>>. Acesso em: 21 jun. 2015.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; DUPONT, B. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002. 1734 p.

LE COUTEUR, P.; BURRESON, J. **Os Botões de Napoleão**: As 17 moléculas que mudaram a História. Rio de Janeiro: Zahar, 2006. 344 p.

LINDO'S PHARMACY COMPANY. How much heat can you handle? **Lindo's Group of Companies**, Devonshire, 25 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.lindos.bm/burning-love/>>. Acesso em: 6 jan. 2015.

LINGUANOTTO NETO, N. **Dicionário gastronômico**: Pimentas com suas receitas. São Paulo: Global. 2007. 164 p.

LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2009. 384 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 576 p.

LUZ, L. P. **Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. 1998. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MARTINS, M. R.; ARANTES, S.; CANDEIAS, F.; TINOCO, M. T.; CRUZ-MORAIS, J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils, **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v.151, p.485–492, 2014.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluído supercrítico. Brasília: **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 185-200, 1996.

McMURRY, J. **Química Orgânica**. 7. ed., São Paulo: Cengage Learning, 2011. 2 v. 1280 p.

MICROBEWIKI. *Aspergillus niger*. **Microbewiki**, [S.l.], 28 ago. 2007. Disponível em: <<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Aspergillusniger.JPG>>. Acesso em: 26 abr. 2015.

MOMESSO, L. S. **Metabolismo vegetal**. Ourinhos: [s.n.], 2010. Apostila elaborada pelo professor Luciano da Silva Momesso, para a disciplina de Farmacognosia I do Curso de graduação em Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO).

MORAES, L. P.; PAZ, M. F.; ARGANDOÑA, E. J. S.; SILVA, L. R.; ZAGO, T. O. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de molho de pimenta “dedo-de-moça” fermentado. **Biochemistry and biotechnology reports**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 33-38, 2012.

MORRIS, C. Black pepper's trip from the farm to your kitchen. **YLSNE**, [S.l.], 21 set. 2011. Disponível em <<http://yummysliciouslady.blogspot.com.br/2011/09/ylsne-journey-of-black-pepper-from-farm.html>>. Acesso em: 26 mai. 2015.

MURRAY, P. R. **Microbiologia clínica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 392 p.

NASCIMENTO, G. M. L.; HERNANDES, K. C.; OLIVEIRA, M. R.; LUZ, R. T.; FRANCISCO, O. Estimativa de sequestro de carbono em áreas de reflorestamento utilizando *Eucalyptus saligna*, Smith (*Myrtales: Myrtaceae*) na cidade de Ourinhos - SP. In: Jornada de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Norte Pioneiro, 1., 2011, Jacarezinho. **Anais**. Jacarezinho: UENP, 2011. 1 CDRom.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. **NCCLS** document M2-A6, Wayne, PA.

NEAS, E.; COLLINS, M. Introduction to microwave sample preparation: Theory and practice. Champaign, IL: **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 1240A–1240A, 1989.

NOGUEIRA, A. R. A. Métodos de preparo de amostras. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE MÉTODOS DOS LABORATÓRIOS DA EMBRAPA, 8, 2003, Jaguariúna. **Preparo de amostras**. São Carlos: Embrapa Pecuária, 2003. p. 13-16.

PEKOK, K. Studies highlight MSRA evolution and resilience. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, 21 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialresistance/pages/aureusbacteria.aspx>>. Acesso em: 27 abr. 2015.

PEREIRA, I. S.; BARRETO, F. Z.; BALSALOBRE, T. W. A.; SALA, F. C.; COSTA, C. P.; CARNEIRO, M. S. Validação de marcadores moleculares associados à pungência em pimenta. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 189-195. 2015.

PERRY, L; DICKAU, R; ZARRILLO, S.; HOIST, I.; PEARSALL, D. M.; PIPERNO D. R.; BERMAN, M. J.; COOKE, R. G.; RADEMAKER, K.; RANERE, A.; RAYMOND, S.; SANDWEISS, D. H.; SCARAMELLI, F.; TARBLE, K.; ZEIDLER, J. A. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L) in the Americas. **Science**, New York, v. 315, n. 5814, p. 986-988. 2007.

PLANETA Sementes. Bode-vermelha. **Sementes de pimentas**, [S.l.], [2014]. Disponível em: <<http://www.planetasemente.com.br/detalhes.asp?id=34&produto=84>>. Acesso em: 10 de mai. 2015.

RAO, P. S.; NAVINCHANDRA, S.; JAYAVEERA, K. N. An important spice, *Pimenta dioica* (Linn.) Merrill: A review. **International Current Pharmaceutical Journal**, Mohammadpur, Dhaka, v. 1, n. 8, p. 221-225, 2012.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum**: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: EMBRAPA, 2000. 113 p.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**: Duque de Caxias, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2006.

ROMÃO, J. A.; BOCCARDO, L.; PAULA, V. F.; CHAGAS, R. J.; MOREIRA, B. O. Toxicidade de extratos de *Piper nigrum*, piperina e piperamidas para o diplópodo *Orthoporus fuscipes* em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 21, n.1, p. 33-38, 2008.

RUKA'S Pepper. As pimentas. **Ruka's Pepper**, São Paulo, [2014]. Disponível em: <<https://rukaspapper.wordpress.com/as-pimentas/>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

SANGHI, A. Rise of the British Empire. **2ndlook**, [S.l.], 6 jul. 2010. Disponível em: <<https://2ndlook.wordpress.com/2010/07/06/rise-of-the-british-empire-a-2ndlook/>>. Acesso em 26 mai. 2015.

SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado. **Galeria**, São Paulo, [2010]. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/agriculturasp/with/5255889500/>>. Acesso em: 5 ago. 2014.

SCHÖPKE, T. Scientific species names. **Köhler's Medizinal-Pflanzen**, [S.l.], [2004]. Disponível em: <<http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-lat.htm>>. Acesso em: 11 abr. 2015.

SHOP DAS PLANTAS. Aroeira Vermelha. **Plantas**, Dona Euzébia, [2015]. Disponível em: <<http://shopdasplantas.com.br/content/images/fotos/55/553706c2cc854.jpg>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

SIGRIST, S. R. Aroeira. **Plantas medicinais**, São Paulo, 18 nov. 2014. Disponível em: <http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp?f_cod=13>. Acesso em: 3 mai. 2015.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia brasileira**, [online], v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007. 1102 p.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGELICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

STARR, F.; STARR, K. *Schinus terebinthifolius* (Brazilian pepper tree, Christmas berry). **Plants of Hawaii**, Makawao, 18 out. 2004. Disponível em: <http://www.starrenvironmental.com/images/image/?q=041018-0009&o=plants>. Acesso em: 16 fev. 2015.

STEIN, S. E. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. **National Institute Of Standards And Technology**. Gaithersburg, 24 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>>. Acesso em: 11 ago. 2015.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. Plant Name Query. **The International Plant Names Index**, [S.l.], 2005. Disponível em: <<http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>>. Acesso em 14 ago. 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TSAFRIR, J. *Candida Albicans* and Mental and Mood Disorders. **Judy Tsafir, M.D.**, Newton Centre, MA, 8 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.judytsafirmd.com/gut-dysbiosis/candidaphoto/>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

TUMA, F. **Viciado em pimenta**: As pimentas e seus efeitos. Monte Alegre do Sul, [2015]. Disponível em: <<http://www.viciadoempimentas.com.br/fotos.php>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Flúidos supercríticos. **Grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental**, São Paulo, [201-?]. Disponível em: <<http://www.usp.br/gpqa/scf.asp>>. Acesso em: 22 mai. 2015.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRONT, T. **Práticas de microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 239 p.

VISAGIE, C. Studies in Mycology 78: Species diversity in *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*. **The Microbiology of the Built Environment Network**, Davis, CA, 12 nov. 2014. Disponível em: <<http://microbe.net/2014/11/12/studies-in-mycology-78-species-diversity-in-aspergillus-penicillium-and-talaromyces/>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

WIECZOREK, M. Quantos países você conhece? **Fast Food Cultural**, Porto Alegre, 3 mai. 2014. Disponível em: <<http://fastfoodcultural.com.br/quantos-paises-voce-conhece-jogo-web/>>. Acesso em: 2 abr. 2015.

WINN, W. JR; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman diagnóstico microbiológico**: Texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.

XAVIER, M. O.; SALES, M. P. U.; CAMARGO, J. J. P.; PASQUALOTTO, A. C.; SEVERO, L. C. *Aspergillus niger* causando traqueobronquite e aspergilose pulmonar invasiva em transplantado de pulmão: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 2, p 200-201, 2008.