

Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da *Pimenta dioica* L. (pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce)

Gustavo Oliveira Everton^{1*}, Rebecca Jemima Pereira Araújo¹, Ana Beatriz da Silva dos Santos¹, Paulo Victor Serra Rosa¹, Rafael Gustavo de Oliveira Carvalho Junior¹, Amanda Mara Teles², Paulo Roberto Barros Gomes³, Victor Elias Mouchrek Filho¹

¹Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleo Essenciais (PCQA-UFMA), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

²Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água (PCQA-UFMA), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Paragominas, Pará, Brasil.

*Autor para correspondência: gustavooliveiraeverton@gmail.com

Recebido: 25 de novembro de 2019

Revisado: 16 de junho de 2020

Aceto: 18 de junho de 2020

RESUMO

Este estudo avaliou a toxicidade e a atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* dos óleos essenciais de *Pimenta dioica* Lindl. e *Citrus sinensis* L. Os óleos essenciais (OE) foram extraídos por hidrodestilação, com caracterização química através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os parâmetros físico-químicos foram determinados de acordo com a Farmacopeia Brasileira. O ensaio de toxicidade seguiu o bioensaio com *Artemia salina* Leach, os OE aprovados neste ensaio seguiram para avaliação das suas propriedades biológicas. A atividade antimicrobiana seguiu a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* utilizando o método de difusão de disco, diluição em caldo para concentração inibitória mínima (CIM) e posterior concentração bactericida mínima para avaliar a ação dos OE frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Ambos os OE apresentaram toxicidade baixa, e assim foram avaliados quanto as propriedades biológicas antimicrobianas. Ambos os OE apresentaram potenciais bactericidas frente aos microrganismos testados, exibindo resultados satisfatórios para a ação deles. Os resultados indicam que os OE avaliados são compostos por substâncias que propiciam e incentivam sua aplicação em virtude de seus potenciais para atividade biológicas moluscicida e antimicrobiana.

Palavras-chave: Óleos essenciais, atividade antimicrobiana, *Pimenta dioica* Lindl., *Citrus sinensis* L., toxicidade.

SUMMARY

Chemical characterization, antimicrobial activity, and toxicity of the essential oils of *Pimenta dioica* L. and *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce)

This study evaluated the toxicity and antimicrobial activity in the face of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of essential oils of *Pimenta dioica* Lindl. and *Citrus sinensis* L. The essential oils (EO) were extracted by hydrodistillation, with chemical characterization by gas chromatography coupled and mass spectrometry (GC-MS). Physicochemical parameters were determined according to the Brazilian Pharmacopeia. The toxicity test followed the bioassay with *Artemia salina* Leach, the EO approved in this assay followed to evaluate its biological properties. The antimicrobial activity followed the methodology described by the Clinical and Laboratory Standards Institute using the disc diffusion method, broth dilution for minimum inhibitory concentration (MIC) and subsequent minimum bactericide concentration for to evaluate the action of EO against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Both OE showed low toxicity, and thus were evaluated for the biological antimicrobial properties. Both OE presented bactericidal potential against the microorganisms tested, showing satisfactory results for their action. The results indicate that the evaluated OE are composed of substances that provide and encourage their application due to their potentials for biological molluscicide and antimicrobial activity.

Key words: Essential oils, antimicrobial activity, *Pimenta dioica* Lindl., *Citrus sinensis* L., toxicity.

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular e insolúveis em água [1] extraídos a partir de diferentes técnicas de extração, tais como a destilação que inclui a destilação por arraste à vapor, prensagem a frio e maceração [2]. Estes OE constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica, perfumaria e afins.

Nos últimos anos, plantas aromáticas e seus produtos têm sido avaliados quanto à sua eficácia em relação à segurança alimentar. Grande parte das suas propriedades são atribuídas aos óleos essenciais e outros componentes do metabolismo secundário das plantas [3], que tem despertado interesse na indústria de alimentos devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana [4].

Dentre várias espécies de plantas compostas por OE em que se podem encontrar estas propriedades encontram-se a *Pimenta dioica* Lindl. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce). A *P. dioica* recebe maior destaque como especiaria, mas também é muito utilizada para o tratamento de certas doenças por possuir propriedades anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, analgésicas, antimicrobianas e antioxidantes [5].

O OE de *C. sinensis* pode ser classificado como uma mistura de terpenos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados, considerados quimicamente instáveis. O OE de laranja doce é constituído por aproximadamente 98% de R-limoneno sendo os 2% restantes referentes a uma mistura de outros terpenos e aldeídos alifáticos [6].

Ao longo dos últimos anos vem sendo procuradas alternativas naturais aos produtos sintéticos, os produtos naturais são uma opção com menor toxicidade em comparação a outros produtos de natureza sintética. Assim, o presente estudo caracterizou quimicamente, avaliou a toxicidade e a atividade antimicrobiana dos OE de *P. dioica* e *C. sinensis*, com a perspectiva de oferecer uma alternativa natural ao uso de antimicrobianos sintéticos.

METODOLOGIA

Obtenção dos óleos essenciais

As folhas de *P. dioica* L. utilizadas neste estudo estão registradas nos arquivos botânicos do Instituto Biodinâmico (IBD) de Botucatu de acordo com certificado n° CA021205. As cascas de *C. sinensis* L foram registradas no Instituto Federal do Maranhão pelo setor de fruticultura, como D-25 (laranja doce, variação: pera).

Obtenção dos óleos essenciais

As folhas de *P. dioica* L. e cascas de *C. sinensis* L. foram coletadas e transportadas para o Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde foram secas em temperatura ambiente, trituradas e armazenadas para extração do OE.

Para extração dos OE, utilizou-se a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor. Foram utilizadas 30 g das folhas secas de *P. dioica* e 120 g das cascas *C. sinensis*, adicionando-se água destilada (1:10). A hidrodestilação foi conduzida a 100 °C por 5 h recolhendo-se o OE extraído. Cada OE foi seco por percolação com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e centrifugado. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob

refrigeração de 4 °C. Posteriormente submetido as análises. O procedimento experimental é apresentado na figura 1.

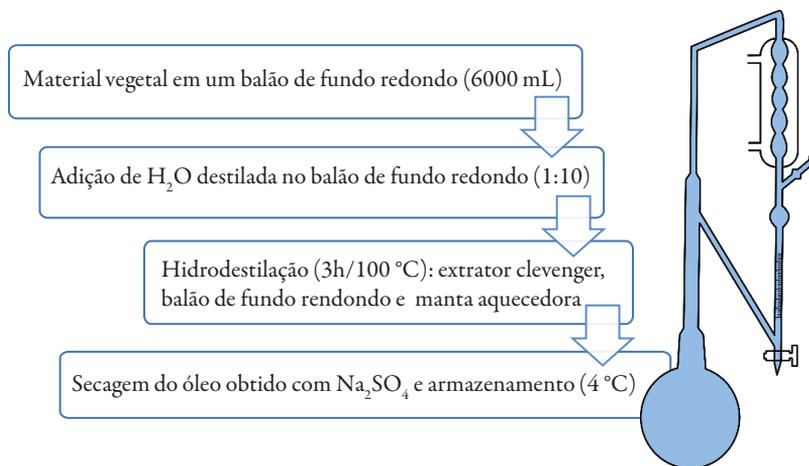


Figura 1. Esquema experimental da extração dos OE.

Os parâmetros físico-químicos dos OE foram determinados: densidade, solubilidade, cor e aparência de acordo com a Farmacopeia Brasileira [7]. O rendimento do OE foi expresso em porcentagem na relação massa/volume pela medida de densidade.

Análises químicas

Os constituintes dos OE foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Foi dissolvido 1,0 mg da amostra em 1000 µL de diclorometano (pureza 99,9%). As condições de análise foram as seguintes: método: Adams. M; volume injetado: 0,3 µL; coluna : capilar HP-5MS (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano) (equivalente DB-5MS ou CP-Sil 8CB LB/MS), nas dimensões (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); gás de arraste: He (99,9995); 1,0 mL.min⁻¹; injetor: 280 °C, modo split (1:10); forno : 40 °C (5,0 min.) até 240 °C numa taxa de 4 °C min⁻¹, de 240 °C até 300 °C (7,5 min) numa taxa de 8 °C min⁻¹; τ_r = 60,0 min; detector: EM; EI (70 eV); modo varredura (0,5 seg scan⁻¹); faixa de massas: 40-500 daltons (uma); linha transferência: 280 °C; filamento: desligado 0,0 a 4,0 min; espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear.

Para a identificação dos compostos na amostra utilizou-se o programa AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System).

Toxicidade

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, foi preparada uma solução salina estoque de cada OE na concentração de 10 000 mg L⁻¹ e 0,02 mg de Tween 80 (tenso ativo). Alíquotas de 5, 50 e 500 µL desta foram transferidas para tubos de ensaio e completados com solução salina já preparadas anteriormente até 5 mL, obtendo-se no final concentrações de 10, 100 e 1000 mg L⁻¹, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, onde dez larvas na fase náuplio foram transferidas para cada um dos tubos de ensaio.

Para o controle do branco utilizou-se 5 mL da solução salina, para o controle positivo K₂Cr₂O₇ e para o controle negativo 5 mL de uma solução 4 mg L⁻¹ de Tween 80. Após 24 h de exposição, realizou-se a contagem das larvas vivas, considerando-se mortas aquelas que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco.

Adotou-se o critério estabelecido por Dolabela [8] para classificação da toxicidade dos OE, sendo considerado altamente tóxico quando CL₅₀ ≤ 80 mg L⁻¹, moderadamente tóxico para 80 mg L⁻¹ ≤ CL₅₀ ≤ 250 mg L⁻¹ e levemente tóxico ou atóxico quando CL₅₀ ≥ 250 mg L⁻¹.

Padronização do inóculo microbiano para ensaios de sensibilidade

Foram utilizadas duas cepas de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Foram identificadas e confirmadas pelas provas bioquímicas: citrato de Simmons (CIT), vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), malonato (MAL), fermentação de carboidratos, descarboxilação de aminoácidos, indol (IND), motilidade (MOT) e produção de H₂S, teste de catalase, teste de coagulase e coloração de Gram e teste da urease (UR).

Culturas microbianas puras mantidas em ágar TSA foram repicadas para caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6 h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* [9].

Método de difusão de disco (MDD)

A técnica de difusão de disco foi realizada segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* [9] que padroniza os testes de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão. Primeiro foram preparadas as placas com o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH) após sua solidificação foi distribuído à suspensão microbiana na superfície

do ágar e deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Logo após são preparados os discos contendo 50 μL dos OE e os discos com concentrações definidas dos antibióticos. Utilizando-se pinça esterilizada, os discos foram distribuídos sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 h. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Esses ensaios foram feitos em triplicata. Os valores dos halos de inibição foram as médias das medidas dos três resultados. Ensaios realizados em triplicata.

Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado empregando-se a técnica de diluição em caldo, proposta pela Clinical and Laboratory Standards Institute [9].

Primeiramente foram preparadas soluções dos OE utilizando-se dimetilsulfoxido (DMSO) a 2%, sendo preparadas diluições seriadas em Caldo MH, resultando nas concentrações de 10 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A cada concentração foram adicionadas suspensão microbiana contendo $1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} das cepas *E. coli* e *S. aureus*. Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 h. Foram realizados os controles de esterilidade e crescimento para o ensaio realizado.

Após o período de incubação, foi verificada CIM dos OE, sendo definida como a menor concentração que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano (ausência de turvação visível). Ensaios realizados em triplicata.

Para o ensaio de concentração bactericida mínima (CBM) empregou-se uma alíquota de 100 μL das diluições provenientes do caldo MH que visivelmente inibiram o crescimento microbiano. As alíquotas foram inoculadas em Ágar Mueller Hinton (AMH) com posterior incubação a 35 °C por 24 h. A CBM foi determinada como a menor dose que visualmente no ensaio de CIM apresentou inibição de crescimento e que na cultura em AMH também não apresentou crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Propriedades físico-químicas

Os parâmetros físico-químicos dos OE são importantes não apenas para determinação da qualidade, como também para o controle da sua pureza e estes são apresentados na tabela 1. Observa-se que o OE de *C. sinensis* obteve um rendimento de 2,47% superior ao OE de *P. dioica* de 1,80%.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos dos OE.

Parâmetro físico-químicos	<i>P. dioica</i>	<i>C. sinensis</i>
Densidade (g mL ⁻¹)	0,9820 ± 0,0012	0,8500 ± 0,0053
Índice de refração (n_D , 25 °C)	1,5185 ± 0,020	1,4760 ± 0,0063
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:3	1:3
Cor	Amarelo	Incolor
Aparência	Límpido	Límpido
Rendimento (%)	1,80 ± 0,35	2,47 ± 0,15

Ao compararmos individualmente o rendimento do OE de *C. sinensis* aos resultados obtidos por Silva *et al.* [10] que extraiu os OE da casca de frutos secos e frescos, os autores perceberam seu rendimento variando entre 1,80-2,00%, sendo que este estudo obteve um rendimento de +0,47% acima do rendimento máximo obtido pelos autores, visto que a densidade dos mesmos autores variou entre 0,8480 a 0,8490 g mL⁻¹, densidade essa que está semelhante este trabalho em uma variação de +0,0010 g mL⁻¹.

Mesmo o rendimento do OE da *P. dioica* sendo menor que o rendimento do *C. sinensis* é importante enfatizar que para os OE rendimentos acima de 1,5% são de extrema significância. Em estudo realizado Voris *et al.* [11] ao extrair esse mesmo OE do fruto adquirido em um mercado varejista do Rio de Janeiro (RJ), os autores empregaram um período de 4 h em sua hidrodestilação, mas seu rendimento máximo foi de 1,60%, comparando-se ao estudo atual que empregou um tempo menor de hidrodestilação (3h-100 °C) e obtivemos um rendimento de 1,80% utilizando uma parte regenerativa da planta, torna-se de extrema importância e significância para a visualização do seu potencial de aplicação.

Comparando os valores para o OE estudado com os da literatura, pode-se observar que houve uma similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento [12]. Sendo importante enfatizar o rendimento de 2,47% para o OE de *C. sinensis* que foi observado em resultados superiores a literatura, incentivando sua produção em virtude do aproveitamento de cascas que são comumente descartadas em feiras públicas ou bairros locais de São Luís-MA.

Caracterização química dos óleos essenciais

Os picos cromatográficos foram identificados através da comparação dos respectivos espectros de massa com os dados das espectroscopias (1) WILEY 139; (2) NIST 107 e (3)

NIST21. De acordo com os resultados obtidos são apresentados na tabela 2 os compostos identificados no OE extraído das cascas de *C. sinensis* e na tabela 3 os compostos identificados no OE extraído das folhas da *P. dioica*.

Como pode ser observado na tabela 2 foram identificados 15 componentes na amostra do OE de *C. sinensis*, sendo o constituinte majoritário do OE d-limoneno com 81,50% da composição, seguido do linalol (6,36%) e do β -Mirceno (2,95%).

Tabela 2. Constituintes químicos na amostra do OE de *C. sinensis*, sendo tr*: Tempo de retenção dos compostos na coluna em minutos.

Pico	tr* (min)	Componentes	Teor (%)
1	5,155	α -Pinoeno	0,33
2	6,350	β -Mirceno	2,95
3	6,861	Octanal	1,93
4	7,610	d-limoneno	81,50
5	8,287	1, Octanol	0,46
6	8,919	Linalol	6,36
7	8,959	Nonanal	1,08
8	9,866	Citronelal	0,06
9	10,523	Terpineol	0,12
10	10,873	α -Terpineol	1,39
11	10,926	Decanal	0,25
12	11,352	β -Citronelol	0,08
13	11,643	Neral	1,13
14	12,210	Citral	1,17
15	12,496	1, Ciclohexano	1,20

O composto químico d-limoneno é confirmado como constituinte majoritário do OE por Araújo *et al.* [13] que ao extraí-lo das cascas de frutos de *C. sinensis* do mercado local de Aracaju, Sergipe realizou a caracterização química do mesmo através de CG/EM e notou a presença do constituinte em 91,88% de sua amostra.

Resultados semelhantes a este estudo também é notificado por Martins *et al.* [14] que ao realizarem a caracterização química de OE comerciais do gênero *Citrus*, observaram a presença do d-limoneno em 83,33% da composição do OE de *C. sinensis*.

O d-limoneno é um terpeno relativamente estável que possui aplicações na literatura para o desenvolvimento de bioprodutos vegetais [15]. Os OE do gênero *Citrus* possuem esse componente como majoritário em sua composição e propriedades como a atividade antimicrobiana pode ser comprovada por Rodrigues [16], porém ao retratarmos o *C. sinensis* seu potencial bactericida foi pouco estudado, sendo relatados muitos trabalhos com relação a sua ação antimicrobiana antifúngica [17] e larvicida [13]. Assim, observa-se que o OE de *C. sinensis* possui potencial para explorarmos sua atividade bactericida neste estudo, sendo de vital importância para o estado e para o país um produto natural obtido através da parte de um vegetal que é comumente descartado ou de aplicações superficiais.

Como pode ser observado na tabela 3 foram identificados 7 componentes na amostra, sendo o constituinte majoritário do OE o eugenol com 85,673%, seguido do chavicol (6,79%) e do mirceno (2,76%).

Tabela 3. Constituintes químicos identificados em amostras do OE de *P. dioica*, sendo tr*: tempo de retenção dos compostos na coluna em minutos.

Pico	tr* (min)	Componentes	Teor (%)
1	8,772	Octenol	1,19
2	9,164	Mirceno	2,76
3	10,488	Limoneno	1,73
4	13,251	Linalol	0,88
5	16,122	Terpineol	0,97
6	19,026	Chavicol	6,79
7	22,755	Eugenol	85,67

O teor de eugenol (85,67%) relatado neste estudo torna-se significativo ao compararmos com Oliveira [18] que extraiu o OE das folhas de *P. dioica* coletadas em Minas Gerais também observou que o eugenol como o constituinte majoritário, porém o teor observado foi de 44,9%. Outro fato relatado foi a presença do limoneno em 10,1% da composição e o chavicol sendo exibindo em um teor de 7,5%. Essa composição também poderá estar ligada ao rendimento inferior de 0,49% obtido por Oliveira [18], ainda sendo ressaltado que os autores utilizaram um tempo de extração de 4 h.

Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira *et al.* [19] utilizando plantas do sul do estado da Bahia coletadas em 2006, onde obtiveram o eugenol (75,07%) como constituinte majoritário da sua amostra do OE das folhas de *P. dioica*, porém diferente

deste estudo componente secundário dos autores foi o mirceno com 8,19% e o chavicol esteve em seguida com 6,35%.

O eugenol é uma molécula extraordinariamente versátil e foi incluída como um aroma picante em sorvete, produtos de panificação e doces em concentrações restritas [20], enxaguatórios bucais, preparações farmacêuticas e dentárias [21,22]. Além de possuir propriedades biológicas comprovadas por Kamatou *et al.* [23], assim é de vital importância o estudo do OE extraído da *P. dioica* como uma fonte natural significativa de eugenol tanto para aplicações biológicas quanto para as indústrias em geral.

Toxicidade

Na tabela 4 são apresentadas as concentrações letais 50% referentes a ação dos OE frente a *Artemia salina* L. e sua posterior classificação segundo o critério de Dolabela [8].

Tabela 4. Concentração Letal 50% para ação dos OE frente a *Artemia salina* L. e classificação dos óleos quanto a sua toxicidade pelo critério de Dolabela.

OE	CL ₅₀	Classificação
<i>P. dioica</i>	141,3 mg L ⁻¹	Moderadamente tóxico
<i>C. sinensis</i>	511,6 mg L ⁻¹	Atóxico

A concentração letal 50% (CL₅₀) refere-se ao ponto em que o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos, e seguindo o critério de Dolabela [8] é possível determinar a toxicidade de produtos naturais visando uma aplicação específica do agente no organismo alvo, visto que óleos com toxicidade elevada não são recomendados para aplicações biológicas.

Na tabela 4 foi possível observar que nenhum dos óleos foi classificado como tóxico, logo, suas aplicações podem ser relativamente aceitáveis e sendo encorajadas. Desta forma, os ensaios de atividade antimicrobiana foram iniciados. É importante ressaltar que o OE de *C. sinensis* extraído das cascas do fruto apresenta até agora um rendimento significativo e componentes químicos de importância biológica e neste ensaio de toxicidade apresenta a CL₅₀ de 511,6 mg L⁻¹, muito acima do critério que era de apenas 250 mg L⁻¹ para ser classificado como atóxico. Logo, este OE tem seu potencial de aplicação novamente incentivado.

É importante enfatizar que estudos relativos à toxicidade de produtos naturais são de vital importância para aplicações biológicas e estudos da literatura ainda não divulgam

toxicidade das plantas em estudo em um teste específico como o bioensaio frente a *Artemia salina*.

Os resultados referentes aos ensaios para determinação da atividade antimicrobiana são apresentados na tabela 5. Todos os óleos apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Tabela 5. Halos de inibição (HI), concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos OE frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

	OE <i>P. dioica</i>				OE <i>C. sinensis</i>		
	GEN 30 μg (mm)	HI (mm)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	HI (mm)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922) Gram-negativa	25 $\pm 1,11$	15 $\pm 0,50$	25 (15-40)	50 (40-70)	15 $\pm 0,70$	75 (40-70)	100 (90-120)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923) Gram-positiva	27 $\pm 1,31$	25 $\pm 1,20$	10 (5-25)	25 (15-35)	30 $\pm 0,90$	10 (40-70)	25 (20-40)

Ao observarmos a tabela 5 notamos que o OE de *P. dioica* foi mais eficiente ao inibir a bactéria *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão de disco se compararmos o seu halo de 25 mm com o 15 mm resultado da ação do óleo frente a *Escherichia coli*. Ambos os halos de inibição permitem classificar as bactérias como sensíveis pelo critério estabelecido por Moreira *et al.* [23]. O ensaio de concentração inibitória mínima revelou que o OE de *P. dioica* inibe o crescimento microbiano de *Escherichia coli* a partir de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de *Staphylococcus aureus* a partir de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O estudo de Oliveira [18], onde a autora relata a atividade do mesmo óleo com uma CIM de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli* e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* retrata a diferença deste estudo onde o mesmo óleo obtido em dois locais diferente possuem propriedades diferentes, visto que o óleo da autora foi mais eficiente frente a *E. coli* do que a *S. aureus*, enquanto que, neste estudo ocorreu o inverso do observado pela autora.

Em um estudo recente Lorenzo-Leal *et al.* [24] em Puebla, México, utilizou a técnica de micropoços para determinar a CIM do OE da *P. dioica* extraída de frutos comercializados e diferentemente deste estudo não observou atividade do óleo frente a *E. coli* e obteve uma CIM extremamente alta de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus*, o que revigora os resultados satisfatórios obtidos neste estudo, onde para *S. aureus* obtivemos uma CIM de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ao notarmos a tabela 5 podemos visualizar que o OE de *C. sinensis* também foi mais eficiente ao inibir a bactéria *Staphylococcus aureus* pelo Método de Difusão de Disco se compararmos o seu halo de 30 mm com o halo de 15 mm resultado da ação do óleo frente a *Escherichia coli*. Ambos os halos de inibição permitem classificar as bactérias como sensíveis pelo critério estabelecido por Moreira *et al.* [23]. O ensaio de concentração inibitória mínima revelou que o OE de *P. dioica* inibe o crescimento microbiano de *Escherichia coli* a partir de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de *Staphylococcus aureus* a partir de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

É importante ressaltarmos que os estudos antimicrobianos no Brasil com a espécie *C. sinensis* são relativamente novos, destacando a importância do estudo para obtenção de um produto natural com potencial biológico obtido de uma parte comumente descartada de um fruto de alto consumo local tanto para o estado quanto para o país.

Desta forma, os resultados obtidos foram comparados aos dos autores Eldahshan e Halim [25] que extraíram o OE das folhas de *C. sinensis* coletadas no Egito realizando uma hidrodestilação por 5 h. Os autores obtiveram um halo de 20,1 mm para a ação do OE frente a *S. aureus* e um resultado semelhante de 16,2 mm frente a *E. coli*, visto que neste estudo obtivemos um halo de 15 mm empregando o OE obtido da casca.

Eldahshan e Halim [25] ainda enfatizam que esse óleo teve essa atividade pela presença dos compostos oxigenados em sua composição. Os autores realçam o potencial do OE para ser utilizado como aditivos antibacterianos em alimentos e em produtos cosméticos em a fim de reduzir a dependência de produtos químicos sintéticos preservação de alimentos [25]. Por fim, destaca-se novamente o potencial biológico de ambas as espécies estudadas neste trabalho como extremamente eficientes no controle de microrganismos patogênicos, representados pela *Escherichia coli* como Gram-negativa e *Staphylococcus aureus* como Gram-positiva.

Através dos resultados obtidos nos estudos químicos, na avaliação da toxicidade e antimicrobiana dos OE de *P. dioica* e *C. sinensis*, conclui-se que os OE avaliados são compostos por substâncias que propiciam e incentivam sua aplicação em virtude de seus potenciais para atividade biológica antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (PCQA-UFMA) e a Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não tem conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. C. Dima, S. Dima, Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity, *Current Opinion in Food Science*, **5**, 29-35 (2015).
2. F. Solórzano-Santos, M.G. Miranda-Navales, Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents, *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 136-141 (2012).
3. J. R. Calo, P.G. Crandall, C.A. O'Bryan, S.C. Ricke, Essential oils as antimicrobials in food systems- A review, *Food Control*, **54**, 111-119 (2015).
4. M. Kfoury, L. Auezova, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity, *Carbohydrate Polymers*, **131**, 264-272 (2015).
5. J.A.M.D. Paula, J.B. Reis, L.H.M. Ferreira, A.C.S. Menezes, J.R. Paula, Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **12**, 363-379 (2010).
6. J.G. Galvão, V.F. Silva, S.G. Ferreira, F.R.M. França, D.A. Santos, L.S. Freitas, P.B. Alves, A.A.S. Araújo, S.C.H. Cavalcanti, R.S. Nunes, β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae, *Thermochimica Acta*, **608**, 14-19 (2015).
7. *Farmacopeia Brasileira*, 5 ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2010.
8. M.F. Dolabella, *Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-T. cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e sintéticos*, tese de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*, Approved Standard, 11th ed., 32, 2015.
10. F.K.B.D. Silva, V.C. Hermes, L.E.M. Machado, M. Leão, R.D.C.D.S. Schneider, C.D.M.D. Silva, *Obtenção do óleo essencial da laranja doce Citrus sinensis (L.) Osbeck a partir das cascas secas e frescas para desenvolvimento de aromatizante de ambiente*, Seminário de Iniciação Científica, 82 2016.
11. D.G.D.R. Voris, C.H. Afonso, C.A. Almeida Filho, C.O. Fernandes, D.Q. Brito, C.S. Moraes, K.E. Avelar, Estudos etnofarmacológicos de óleos essenciais com atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, *Semioses*, **11**, 86-94 (2017).

12. D.A. Costa, G.A.L.D. Oliveira, J.P. Costa, G.F.D. Souza, D.P.D. Sousa, R.M. Freitas, Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona, *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, **16**, 303-310 (2012).
13. A.F.D.O. Araujo, J.T. Ribeiro-Paes, J.T.D. Deus, S.C.D.H. Cavalcanti, R.D.S. Nunes, P.B. Alves, M. D.L.D.G. Macoris, Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **111**, 443-449 (2016).
14. G.D.S.O. Martins, H.B. Zago, A.V. Costa, L.M.D. Araujo Junior, J.R.D. Carvalho, Chemical composition and toxicity of Citrus essential oils on *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), *Revista Caatinga*, **30**, 3, 811-817 (2017).
15. D.R. Granja, F.K.B.D. Silva, J. Eizemann, L.E.M. Machado, C.D.M.D. Silva, L.T. Kist, *Obtenção do óleo essencial das cascas de Citrus sinensis L. para desenvolvimento de bioprodutos vegetais*, *Seminário de Iniciação Científica*, 73, 2015.
16. V. Mello Avelar-Costa, P. Sena da Mata, K.C. Ugolini-Mugnol, Atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. Bergamia associado a antibióticos, *Revista Científica UMC*, **4**(3), 1-5 (2018).
17. L.D. Rodríguez-Rodríguez, Á.A. Jiménez-Rodríguez, W. Murillo-Arango, E.A. Rueda-Lorza, J. Méndez-Arteaga, Actividad antimicrobiana de cáscaras y semillas de *Citrus limonia* y *Citrus sinensis*, *Actualidades Biológicas*, **39**, 53-59 (2017).
18. F.S. Oliveira, *Atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais aplicados na preservação de lingüiça frescal de frango*, tese de mestrado, Montes Claros, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.
19. R.A. Oliveira, T.V. Reis, C.K. Sacramento, L.P. Duarte, F.F. Oliveira, Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**, 771-775 (2009).
20. K.P. Padmakumari, I. Sasidharan, M.M. Sreekumar, Composition and antioxidant activity of essential oil of pimento (*Pimenta dioica* (L) Merr.) from Jamaica, *Natural Product Research*, **25**, 152-160 (2011).
21. M. Martinez-Velazquez, G.A. Castillo-Herrera, R. Rosario-Cruz, J.M. Flores-Fernandez, J. Lopez-Ramirez, R. Hernandez-Gutierrez, E. de C. Lugo-Cervantes, Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*,

- Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), *Parasitology Research*, **108**, 481-487 (2011).
22. G.P. Kamatou, I. Vermaak, A.M. Viljoen, Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule, *Molecules*, **17**, 6953-6981 (2012).
 23. M.R. Moreira, A.G. Ponce, C.E. del Valle, S.I. Roura, Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, *LWT-Food Science and Technology*, **38**, 565-570 (2005).
 24. A.C. Lorenzo-Leal, E. Palou, A. López-Malo, H. Bach, Antimicrobial, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of *Pimenta dioica* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, *BioMed Research International*, **2019**, ID 1639726 (2019).
 25. O.A. Eldahshan, A.F. Halim, Comparison of the composition and antimicrobial activities of the essential oils of green branches and leaves of Egyptian navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. *malesy*), *Chemistry & Biodiversity*, **13**, 681-685 (2016).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

G. Oliveira-Everton, R.J. Pereira-Araújo, A.B. da Silva dos Santos, P.V. Serra-Rosa, R.G. de Oliveira-Carvalho Junior, A.M. Teles, P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek Filho, Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da *Pimenta dioica* L. (pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(3), 641-655 (2020).