

EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA-PRETA (*Piper nigrum* L.), BIOMONITORADO POR *Artemia salina* Leach

A.M. MELO^{1*}, E. O. SILVA², D. I. D. MARQUES³, S. SOUSA⁴, M. R. QUIRINO⁵Universidade Federal do Paraná¹, Universidade Federal da Paraíba²⁻⁵ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7795-6682>¹anely-maciel@live.com¹

Submetido 04/07/2020 - Aceito 18/12/2020

DOI: 10.15628/holos.2021.10663

RESUMO

Os óleos essenciais são eficazes agentes antimicrobianos devido aos compostos bioativos que possuem. Objetivou-se extrair e identificar os constituintes químicos do óleo essencial da pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), estudar o seu potencial antimicrobiano e biomonitorar o óleo através do teste de potencial citotóxico. Extraiu-se o óleo essencial pelo método de destilação por arraste a vapor. O óleo foi analisado quanto a sua composição química e submetido ao biomonitoramento por *Artemia Salina* Leach e posterior teste de atividade antimicrobiana e de concentração inibitória mínima (CIM). O material vegetal apresentou rendimento de 1,15% de óleo essencial, onde 38 compostos foram identificados por cromatografia,

sendo os constituintes majoritários: sabinene (30,62%), limoneno (21,43%), cariofileno (21%), β - pineno (9,62%) e α - pineno (5,31%). O óleo essencial apresentou CL50 8,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a *Artemia salina* Leach. As bactérias *Listeria innocua* (15,60 mm) e *Escherichia coli* (5,60 mm), apresentaram menor e maior resistência ao óleo essencial estudado, respectivamente. *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens* apresentaram menor CIM, com 30.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Desta forma, o óleo essencial de pimenta preta mostra-se um antimicrobiano promissor, sendo uma possibilidade de aplicação futura, como um conservante natural na indústria de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais, compostos bioativos, cromatografia gasosa, micro-organismos, toxicidade.

EXTRACTION, IDENTIFICATION AND STUDY ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF THE BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.) ESSENTIAL OIL BIOMONITORED BY *Artemia salina* Leach

ABSTRACT

The essential oils are effective antimicrobial agents due to the bioactive compounds they have. The objective was to extract and identify the chemical constituents of the essential oil of black pepper (*Piper nigrum* L.), study its antimicrobial potential and biomonitor the oil through the cytotoxic potential test. The essential oil was extracted by steam distillation. The oil was analyzed for its chemical composition and subjected to biomonitoring by *Artemia Salina* Leach and subsequent antimicrobial activity and minimal inhibitory concentration (MIC). The plant material showed a yield of 1.15% of essential oil, where 38 compounds were identified by

chromatography, the major constituents being: sabinene (30.62%), limonene (21.43%), karyophyllene (21%), β - pinene (9.62%) and α - pinene (5.31%). The essential oil showed CL50 8.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ compared to *Artemia salina* Leach. The bacteria *Listeria innocua* (15.60 mm) and *Escherichia coli* (5.60 mm), presented lower to greater resistance to the essential oil studied, respectively. *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* presented lower MIC, with 30.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Thus, black pepper essential oil is a promising antimicrobial, being a possibility of future application, as a natural preservative in the food industry.

KEYWORDS: Natural products, bioactive compounds, gas chromatography, microorganisms, toxicity



1 INTRODUÇÃO

A crescente busca por alimentos saudáveis induzem as indústrias a comercializarem produtos com teores reduzidos de gordura, aditivos e conservantes químicos, priorizando a qualidade do produto final. Com isso, pesquisas relacionadas a produtos naturais ricos em compostos bioativos e que apresentem características antimicrobianas estão cada vez mais frequente, se tornando uma tendência e alternativa para a conservação de alimentos.

De acordo com Dong et al. (2014), as bactérias estão sofrendo processos de mutações e alguns dos antimicrobianos utilizados anteriormente, objetivando inibição, já não apresentam atividade. Por isso, tem-se a necessidade de aprofundar estudos acerca deste assunto. O uso de produtos naturais e seus derivados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e química tem aumentado, devido a fatores como a proliferação microbiana e sua multirresistência aos antibióticos e aos agentes químicos sintéticos (Silva et al. 2015).

Um produto alternativo com potencial aplicação na indústria de alimentos são os óleos essenciais, ricos em compostos bioativos voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor, sendo sintetizados por plantas durante o metabolismo secundário e normalmente extraído de vegetais encontrados em países quentes (Machado; Fernandes Júnior, 2011; Yazgan, 2020). Uma das vantagens da utilização dos óleos essenciais é que grande parte dos compostos ativos da planta estão presentes em maior quantidade no óleo (Oetting, 2005), fazendo com que os benefícios causados pelo material, quando adicionado ao alimento, sejam mais eficazes comparando a outras partes da planta.

As especiarias são conhecidas por exercerem estabilidade frente à ação de micro-organismos, estando inseridas no grupo dos alimentos estáveis (Lima, 2002). A literatura científica na área da ciência e tecnologia de alimentos tem mostrado, nos últimos anos, um enfoque no estudo do potencial antimicrobiano das especiarias, considerando a sua inclusão nos chamados sistemas de bioconservação de alimentos (Melo et al. 2020).

Dentre as especiarias comumente utilizadas em alimentos está a pimenta-preta (*Piper nigrum L.*). O óleo essencial de pimenta-preta, também conhecido como pimenta-do-reino, tem uso diverso entre as indústrias. Ristori, Pereira e Gelli (2002) afirmaram que um dos componentes que contribuem para aumentar o valor da pimenta-preta no mercado como condimento é o seu óleo essencial, devido à ação inibitória desta especiaria em diferentes micro-organismos. Desta forma, o uso deste óleo na indústria de alimentos é uma alternativa viável como conservante natural em alimentos.

Diante disto, observa-se que a utilização do óleo essencial de pimenta-preta além de agregar valor aos produtos, serve como agente ativo para prolongar a vida útil de alimentos, mantendo suas características. Por isso, objetivou-se neste trabalho extrair e identificar os constituintes químicos do óleo essencial da pimenta-preta (*Piper nigrum L.*), estudar o seu potencial antimicrobiano e avaliar o potencial citotóxico em *Artemia salina Leach*, a fim de compreender a atividade deste material vegetal.



2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pimenta-preta

A pimenta-preta, conhecida botanicamente como *Piper nigrum* L., é uma planta perene da família das piperáceas (Silva; Silva; Joele, 2009) e, segundo Mobot (2005), é uma planta com caule liso, redondo, nodoso e ramificado, com folhas inteiras, lâminas ovaladas, ápice agudo, coriáceas e com sete nervuras principais. Já as flores são pequenas, brancas, dispostas em espigas e com os frutos globulares, vermelhos quando maduros, que ao secarem possuem uma superfície grossa e rugosa.

Entre as espécies mundialmente conhecidas e consumidas de pimenta, tem-se a pimenta-preta, conhecida popularmente no Brasil como pimenta-do-reino (Calixto *et al.*, 2005; Pissinate, 2006). A pimenta-preta é originária da Índia e, desde a década de 1930, quando foi introduzida no Brasil, por imigrantes japoneses, tem sido o suporte econômico de pequenos e grandes produtores da Região Amazônica (Chu, 2006). O Brasil é um dos maiores produtores desta especiaria e o segundo maior exportador mundial dessa *commodity*, tendo os estados do Pará, Espírito Santo, Bahia, Paraíba e Maranhão como os maiores produtores nacionais (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2013; Alves *et al.*, 2014).

A comercialização nacional da pimenta-preta é vista comumente em grãos secos (Figura 1), obtida por secagem natural ou artificial, ou moída, principalmente para uso culinário, sendo considerada como a única especiaria cujos frutos podem ser comercializados em quatro diferentes versões: branca, verde, vermelha e preta (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – [MAPA], 2006; Carnevallia e Araújo, 2013).



Figura 1: Semente da pimenta-preta

Sabe-se que esta é uma planta rica em retinol (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e em minerais como ferro e potássio entre outros compostos, por isso seu forte uso culinário. Porém, nas últimas décadas, seu consumo além do grão seco ou moído, diversificou-se através da

obtenção do óleo essencial, resina e oleorresina, devido a quantidade de compostos isolados encontrados na espécie (Silva; Silva; Joele, 2009; Carnevallia; Araújo, 2013), tornando os compostos da pimenta-preta alvo de estudos para avaliar sua atividade.

2.2 Óleo essencial

Koketsu e Gonçalves (1991) citam que os óleos essenciais, em sua maioria, são produtos obtidos por processo de destilação por arraste com vapor de água ou hidrodestilação, podendo também ser extraído por outras metodologias. Estes podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados (Zacarão; Piletti, 2013). De acordo com Koketsu e Gonçalves (1991), óleo essencial é uma designação que se aplica a óleos etéreos ou voláteis constituídos de misturas complexas de substâncias de variada função química, presentes em diversas partes dos vegetais como: flores, folhas, frutos, lenho e sementes.

Os óleos essenciais são conhecidos pela fragrância e propriedades fortes pela sua atividade antisséptica, ou seja, bactericida, fungicida, antivirais e medicinais e podem ser utilizados como antimicrobianos na conservação de alimentos, além de analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios (Aquino et al., 2010). Por isso os óleos essenciais tornaram-se fonte de pesquisa, objetivando explorar a atividade realizadas pelos compostos presentes nos vegetais, tornando-se uma alternativa natural, principalmente para conservação de alimentos, tendo em vista a atual procura por uma alimentação saudável e mais próxima do natural.

A parte do vegetal em que o óleo essencial é encontrado depende da espécie, embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo sua localização na estrutura do vegetal, assim como composição química, a qualidade e o teor de óleos essenciais presentes nas plantas estão sujeitos à grande variação e são influenciados por diversos fatores, tais como: condições geográficas e climáticas, assim como condições de cultivo, secagem e armazenamento (Melo et al., 2004; Simões et al., 1999).

Os óleos essenciais são geralmente extraídos das plantas por métodos de destilação, que pode ser simples ou por arraste a vapor, dióxido de carbono (CO₂) supercrítico, hidrodestilação e extração por solvente (Simões & Spitzer, 1999). Leal (2008) cita a popularidade da técnica de destilação por arraste a vapor (AV) afirmando que é o processo de obtenção de óleos voláteis mais tradicionalmente utilizado no Brasil e no mundo, mostrando que é uma metodologia considerada limpa e que não agride o meio ambiente.

2.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Antimicrobianos de origem natural, provenientes de vegetais, são alternativas eficazes e na maioria das vezes econômicas, pois são obtidos a partir das plantas aromáticas e especiarias ricas em óleos essenciais caracterizados por uma notável atividade antimicrobiana, tornando-se viável no retardamento ou inibição do crescimento de micro-organismos e pragas.

O estudo de óleos essenciais para conservação e atividade antimicrobiana está cada dia mais frequente. Os componentes dos óleos essenciais exercem atividade antimicrobiana



basicamente por três motivos: interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular por aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais e inativação ou destruição do material genético (Kim, 1995; Ristori; Pereira; Gelli 2002)

A atividade dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários podem variar quando avaliados separadamente. Em seu estudo com o óleo essencial de *Thymus pectinatus*, Vandar-Unlu et al. (2003), encontraram uma composição majoritária de timol, γ -terpineno, p -cimeno e carvacrol, verificando uma boa atividade antimicrobiana, porém, quando comparados separadamente, esses compostos apresentaram baixa atividade, mostrando que a atividade está relacionada com o conjunto de substâncias.

Em um estudo realizado por Romero et al. (2012) com o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre fungos fitopatogênicos testado em quatro concentrações, observou-se que todos os fungos testados apresentaram inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos pela ação do óleo essencial, para concentrações a partir de 500 ppm. Na concentração de 250 ppm (menor concentração), observou-se que o óleo essencial de orégano inibiu o crescimento micelial dos fungos *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*, em 64,81, 73,95 e 33,58%, respectivamente, não afetando o crescimento micelial e a germinação de esporos do fungo *Rhizoctonia solani*.

Brahmi et al., (2016) verificaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha pulegium* L. em cinco micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, pelo método de disco-difusão, e verificaram que o óleo testado apresentou boa atividade de inibição de crescimento microbiano. Santos e Rabelo (2012) pesquisaram atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum*. Para todas as bactérias analisadas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), o óleo essencial apresentou atividade classificada como fraca. Todavia, o óleo essencial apresentou ótima atividade contra seis dos dez fungos analisados.

Outro estudo realizado por Pereira (2006) avaliou o efeito do óleo essencial de duas especiarias: orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), nas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e também o fungo *Penicillium commune*, verificando bons resultados quanto às bactérias testadas, mostrando a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais testados. Há uma diversidade de estudos relacionados aos óleos essenciais, a fim de descobrir os efeitos de seus variados compostos no comportamento dos micro-organismos. Entretanto, todos os estudos apontam que os óleos essenciais são um ingrediente de potencial aplicação na indústria de alimentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração do óleo essencial



As sementes de pimenta-preta foram compradas no município de João Pessoa – PB, Brasil (07º 06 '55 "S, 34º 51' 40" W). O óleo essencial da pimenta-preta foi extraído através do método de destilação por arraste a vapor, com o destilador de óleo essencial em aço inox do modelo SL76/I da marca SOLAB e potência de 1.800 Watts. O processo de destilação foi realizado por 3h e a temperatura foi controlada a 100 °C. Após o processo de destilação, foi retirado o excesso de água do óleo essencial com o sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). O rendimento de extração foi calculado a partir da razão de massa de óleo, medida por sua densidade com base no volume (mL) de óleo extraído no sistema de extração e dividido pela massa seca (g) da amostra (Girard, 2007). O óleo foi armazenado em recipiente de vidro âmbar e mantido sob refrigeração a 4 °C.

3.2. Cromatografia Gasosa

A composição química do óleo essencial de pimenta-preta foi analisada por meio do Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas do modelo GCMS-QP2010 da marca Shimadzu. A coluna utilizada foi da marca RTX-5MS, capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane), Tamanho: 30 mm de comprimento e 0,25 mm de Diâmetro Interno, 0,25 µm (df – diâmetro do filtro da coluna), temperatura do forno da coluna de 60 °C, temperatura de injeção de 250 °C, pressão de 57 kPa, fluxo da coluna de 0,99 mL/min. O espectrômetro de massa foi programado para varrer de 40,0 a 450,0 m / z.

3.3. Atividade citotóxica

A toxicidade do óleo essencial de pimenta-preta foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Meyer et al., (1982). O bioensaio consistiu em inserir os ovos de *Artemia salina* em uma solução preparada com o óleo essencial solubilizado em água salina e Tween 80, sob aeração constante por um período de 48 horas, a temperatura controlada (25 °C). As concentrações variaram entre 0 e 1000ppm. Após 24 h de exposição, quantificaram-se as contagens de microcrustáceos vivos e mortos.

3.4. Atividade antimicrobiana

3.4.1. Cepas bacterianas

Para realização da atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta utilizou-se três culturas de bactérias patogênicas Gram positivas e duas culturas de bactérias Gram negativas. As Gram positivas utilizadas foram: *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Listeria monocytogenes* (ATCC 1911) e *Clostridium perfringens* (ATCC 3624); as bactérias Gram negativas foram *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* (ATCC 33560) e *Escherichia coli* (ATCC 10536). Todos os micro-organismos foram adquiridos no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, ligado a Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

3.4.2. Disco-difusão



Para a avaliação da atividade antimicrobiana seguiu-se a metodologia de disco-difusão em Ágar conforme descrito na norma M2-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI/NCCLS (NCCLS, 2005), que trata dos testes de sensibilidade a antimicrobianos. Os testes foram realizados pelo método de difusão em discos de papel Whatmann 3 com 6 mm de diâmetro, feitos com um perfurador estéril, e adicionados em placas de Petri com meio de cultura Ágar Müller-Hinton. Os discos foram embebidos em 10 µL contendo óleo essencial a 1% e distribuído uniformemente nas placas contendo as bactérias. Estas placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi analisada medindo-se o diâmetro das zonas de inibição (mm) ao redor do halo usando um paquímetro.

3.4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima foi realizada através da micro diluição em caldo BHI (Brain Heart Infusion), seguindo a Norma M2-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI/NCCLS (NCCLS, 2005), com incubação das bactérias em placas de Petri e posterior adição dos discos contendo óleo essencial de pimenta-preta para verificação dos halos. Para verificação da CIM, após incubação a 35 °C por 24 horas das placas de Petri, contendo os discos embebidos, a menor concentração de óleo na qual não foi evidenciado crescimento microbiano nos discos foi determinada como CIM, conforme descreve Machado et al., (2012).

3.5. Análise estatística

Para avaliação citotóxica do óleo, o resultado foi expresso pela dose letal à 50% (CL50) com limite de confiança de 95%, calculado através do método estatístico de Próbit, utilizando o programa Polo-plus 1.0 (2002). Os dados da atividade antimicrobiana foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SAS® versão 9.1 (2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento de extração

O óleo essencial de pimenta-preta obtido na extração apresentou coloração amarelada. A amostra apresentou densidade de 0,8262 g/mL a 25 °C, valor inferior ao obtido por Melo *et al.* (1990) que estudaram alternativas de aproveitamento industrial de pimenta-preta e obtiveram densidade de 0,8772 g/mL.

O óleo essencial de pimenta-preta apresentou rendimento de 1,15%. Este valor foi inferior a Costa *et al.*, (2010), que em seu estudo com óleo essencial de pimenta-preta obtiveram rendimento de 1,8%, valor superior ao presente estudo, e corroborou com o trabalho de Melo et al. (1990) que também obtiveram 1,8% para o óleo desse vegetal, quando a amostra foi seca em secador solar. Segundo Luiz *et al.*, (2009), o conteúdo presente nos óleos essenciais e seu rendimento podem variar de acordo com a espécie, parâmetros climáticos e de fatores agrônômicos e, especialmente a fase de desenvolvimento da planta na época da colheita, além de



outros fatores. Este fato mostra que o rendimento atingido neste estudo é decorrente do manejo e condições externas sofridas pelas sementes, acarretando menor teor de óleo essencial.

4.2. Composição química

Os resultados da análise cromatográfica do óleo essencial de pimenta-preta (Tabela 1) elucidou 96,74% dos constituintes químicos em diferentes proporções, totalizando em 38 compostos, possuindo como componentes majoritários quatro monoterpenos: sabineno (30,62%), limoneno (21,43%), β -pineno (9,62%), α -pineno (5,31%) e careno (2,37%). Além dos monoterpenos, dentre os compostos de maior concentração no óleo encontrou-se o sesquiterpeno cariofileno (21,00%).

Tabela 1: Perfil cromatográfico do óleo essencial de pimenta-preta e índice de Kovats.

	COMPONENTES	ÁREA (%)	TR (min)
1	(3,3-dimetil -Hexan-2-ona)	0,04	5,16
2	2,2-dimetil Pentanal,	0,03	5,60
3	α -Thujeno	1,93	5,70
4	α -Pineno	5,31	5,92
5	Camphene	0,05	6,33
6	1-acetil-I, 2-epoxi Ciclopentano	0,01	6,86
7	Sabineno	30,62	7,09
8	β - Pineno	9,62	7,20
9	Myrceno	1,17	7,50
10	α - Felandreno	0,73	8,00
11	Careno	2,87	8,21
12	α - Terpineno	0,20	8,40
13	<i>p</i> -Cymeno	0,09	8,69
14	Limoneno	21,43	8,92
15	3,7-dimetil-octa-1,3,6-trieno	0,09	9,49
16	γ - Terpineno	0,34	9,94
17	Cis- β -terpineol	0,16	10,26
18	Terpinoleno	0,03	11,03
19	Terpinoleno	0,20	11,13
20	3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol	0,18	11,51
21	1-metil-4- (1-metiletil) - 2-ciclohexen-1-ol,	0,02	13,22
22	4-metil-4- (1-metiletil) - 3-ciclohexen-1-ol,	0,62	14,89
23	α - Terpeneol	0,06	15,46
24	3,7-dimetil-, (Z) - 2,6-octadienal	0,02	17,66
25	3,7-dimetil- (Z) - 2,6-octadienal	0,04	18,98
26	4-etenil-4-metil-3- (1-metil) - ciclo-hexeno,	0,22	21,96
27	Copaeno	0,05	23,67



28	(1-metil) 1-etenil-1-metil-bis-2,4- Ciclo-hexano,	0,21	24,38
29	Cariofileno	21,00	25,75
30	1H-ciclopropa [a] naftaleno, 1, 2,3,5,6,7,7a	0,14	26,16
31	α - Cariofileno	0,58	27,06
32	1,2,3,4,4a, 5,6,8a-octa-hidro-7-metil - naftaleno,	0,13	28,02
33	1,2,3,4,4a, 5,6,8a-octa-hidro-4a, 8-metil - naftaleno	0,24	28,45
34	β - Selineno	0,30	28,81
35	1,2,4a, 5,6,8a-hexa-hidro-4,7-dimetil-Naftaleno	0,04	29,02
36	1-metil-4- (5-metil-1-metil) - ciclo-hexeno,	0,48	29,32
37	Sesquisabineno	0,03	29,94
38	4-etenil- α - ciclohexanometanol	0,30	31,03
Total		96,77	-

TR: Tempo de retenção

A composição química média do óleo essencial da pimenta-preta possui cerca de 80% de monoterpenos como hidrocarbonetos monoterpênicos (sabineno, β -pineno, limoneno, terpineno, α -pineno, mirceno), monoterpenos oxigenados (borneol, carvona, carvacrol, 1,8-cineol e linalol) 20% de compostos sesquiterpênicos (β -cariofileno, humuleno, β -bisabolona e óxido carofileno) e com quantidades vestigiárias de eugenol, miristicina e safrol (Cunha et al., 2012). Orav et al., (2004) e Liu et al., (2007) afirmaram que os constituintes de maior proporção são: β -cariofileno, d-limoneno e β -pineno, evidenciando que o óleo essencial extraído apresenta um perfil cromatográfico com substâncias majoritárias semelhantes as desenvolvidas em outros estudos. Costa et al. (2010) avaliando a composição química de diferentes espécies de Piper evidenciaram 97,3% dos componentes totais para o óleo de Piper nigrum, referente a 17 substâncias. Os constituintes majoritários encontrados por Costa e seus colaboradores (2010) foram similares aos encontrados na cromatografia realizada neste estudo: E-Cariofileno (24,2%), (20,01%), Sabineno (19,9%), Limoneno (13%) e Pineno (5,4%). Sendo esses compostos considerados antimicrobianos.

Souza Filho et al. (2009) confirmam que existe considerável variação na composição dos constituintes do óleo essencial de certas espécies de plantas e que esta variação pode ser função da sazonalidade, das condições edafoclimáticas, da diferença entre indivíduos de diferentes populações ou mesmo de uma mesma população. Além dos fatores intrínsecos da planta, a metodologia de extração do óleo, tempo de extração, manuseio de armazenamento do óleo, exposição do óleo durante extração. Além de também apresentarem diferenças nas proporções dos componentes, pois os compostos ativos dos óleos essenciais são altamente voláteis (Machado; Fernandes Junior, 2001). Com isso, são facilmente perdidos até mesmo durante a extração.

4.3. Atividade citotóxica

No ensaio de toxicidade de *Artemia Salina* Leach os índices de mortalidade variaram entre 0 e 100% nas proporções utilizadas. A concentração letal de óleo essencial de pimenta-preta



necessária para matar 50% dos microcrustáceos (CL₅₀) foi calculada em 8,49 µg/mL (Tabela 2), variando de 7,87 a 21,53 µg/mL entre as CL₅₀ e CL₉₀. O teste de toxicidade por *Artemia salina* é um teste biológico considerado uma das ferramentas utilizadas na avaliação preliminar de toxicidade (Luna, 2005). Meyer et al., (1982) menciona que teste com *Artemia salina* pode ser utilizado por farmacologistas e químicos de produtos naturais. Os autores explicam que para a concentração letal ser considerada tóxica o óleo deve conter CL₅₀ ≤ 30 ppm. Assim, nota-se na Tabela 3 que o óleo essencial de pimenta-preta apresentou atividade tóxica para o teste em *Artemia Salina*. Isto indica que este óleo essencial possui benefício ao consumidor, quando aplicado em dosagens adequadas, por se tratar de um teste preliminar com atividade anticâncer, inseticida, moluscicida e antifúngico (McLaughlin, Chang & Smith 1991; Assis et al., 2019)

Tabela 2 – Concentração letal do óleo essencial de pimenta-preta

Concentração letal	Concentração (µg/mL)	Limite de confiança (µg/mL)
CL ₅₀ µg/mL	8,49	7,87 < CL < 9,48
CL ₉₀ µg/mL	14,33	13,04 < CL < 17,70
CL ₉₅ µg/mL	16,62	14,88 < CL < 21,53

*CL: Concentração letal

4.4. Atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima

As zonas de inibição de crescimento das bactérias variaram significativamente ($p < 0,05$) com o teste de disco-difusão do o óleo essencial de pimenta-preta (Tabela 3). *Listeria innocua* mostrou-se menos resistente a ação do óleo essencial, apresentando a maior zona de inibição, com 15,60 mm e menor concentração inibitória mínima (CIM). O micro-organismo em que o óleo essencial foi menos efetivo para o ensaio antimicrobiano foi *Escherichia coli*, com zona de 5,60 mm e maior CIM.

Table 3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta-preta

Micro-organismos	Óleo essencial de pimenta-preta	
	Zona de inibição (mm)	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)
<i>Listeria innocua</i>	15,60 ^a ± 1,68	10,10
<i>Escherichia coli</i>	5,60 ^e ± 1,23	63,83
<i>Campylobacter jejuni subsp. Jejuni</i>	8,20 ^d ± 0,83	30,92
<i>Listeria monocytogenes</i>	11,49 ^b ± 0,38	20,41
<i>Clostridium perfringens</i>	9,40 ^c ± 0,15	30,92

As zonas de crescimento avaliadas variaram entre 5,60 e 15,60 mm, esses valores variam entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e com o comportamento do micro-organismo com os compostos presentes no óleo. Zaccarão e Piletti (2013) afirmam que as bactérias Gram-negativas apresentam maior resistência à ação de agentes antimicrobianos por terem uma



superfície hidrofílica na membrana externa, rica em lipopolissacarídeos, formando uma barreira contra as macromoléculas hidrofóbicas presentes em alguns óleos essenciais e antibióticos. Por isso a *Escherichia coli* e a *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* mostraram maior resistência ao óleo essencial de pimenta-preta, enquanto *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* foram menos resistentes e obtiveram maiores zonas e inibição.

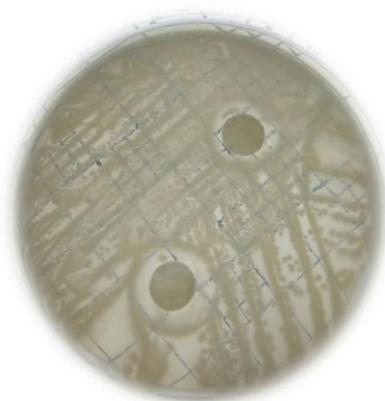


Figura 2: Halo de inibição da ação do óleo essencial de pimenta-preta em *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*

Zacarão e Piletti (2013) observaram em seu estudo com óleo essencial de pimenta-preta para controle de crescimento microbiano que a bactéria *S. aureus*, reduziu o crescimento em aproximadamente 95% para a concentração de 0,02 mL/mL e ressalta, que para as menores concentrações também se observou redução no crescimento de *Escherichia coli* em aproximadamente 30%, mostrando que o óleo tem grande potencial de aplicação para este micro-organismo.

Ristori, Pereira e Gelli (2002) mostram em seus resultados, também com redução do crescimento microbiano, que não foi apresentada diferença significativa entre os seus meios controles e os meios testes, mostrando assim que a pimenta-preta moída e o seu óleo essencial não foram eficientes para inibir o desenvolvimento de *Salmonella rubislaw*. Eles afirmam que a inibição pode ocorrer em diferentes micro-organismos e que o óleo essencial pode não se solubilizar de forma adequada, interferindo na inibição, assim como a variação na composição do óleo em função das condições de cultivo também alteram a composição do óleo. Confirmando o estudo de Ristori, Pereira e Gelli (2002), Stoyanova et al. (2006) demonstraram uma atividade antimicrobiana significativa dos óleos essenciais de pimenta-preta contra bactérias Gram positivas. Verifica-se que o óleo essencial de pimenta-preta mostrou-se eficaz com o estudo antimicrobiano, sendo um material rico em compostos bioativos que possam proporcionar novos estudos e aplicações na área de alimentos.

5. CONCLUSÃO

O óleo essencial de pimenta-preta mostrou-se um material com rendimento satisfatório para este tipo de produto e que apresentou característica antimicrobiana para micro-organismos patogênicos que são capazes de se desenvolver em alimentos. Com isso, o óleo essencial em estudo mostra-se um antimicrobiano promissor de potencial fonte de aplicação, como um conservante natural na indústria de alimentos.

6. REFERÊNCIAS

- Alves, D. A.; Perazzini, H.; Freire, F. B.; Freire, J. T. Análise da utilização de modelos difusivos na secagem de pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum* L.). In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ), Área temática: Fenômenos de Transporte e Sistemas Particulados. 2014.
- Aquino, L.C.L.; Santos, G.G.; Trindade, R.C.; Alves, J.A.B.; Santos, P.O.; Carvalho, L.M.; Alves, P.B.; BLANK, A.F. (2010). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cideira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. *Revista Alimentação e Nutrição*. 21(4), 529-535.
- Assis, R, Q; K.L. Andrade, L.E. Gomes Batista, A. de Oliveira Rios, D.R. Dias, E.A. Ndiaye, É.C. de Souza. (2019) Characterization of mutamba (*Guazuma ulmifolia* LAM.) fruit flour and development of bread, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 19, 101-120. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101120>
- Brahmi, F.; Abdenourb A.; Brunoc, M.; Silviac, P.; Alessandrac, P.; Daniloc, F.; Drifaa, Y. G.; Fahmie, E. M.; Khodira, M.; Mohamed, C. (2016). Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidante activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Ind. Crops Prod.* v. 88, p. 96 – 105.
- Calixto, J.B. et al. (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther.*, v.106, n.1, p.109- 178.
- Carnevallia, D. B.; Araújo, A. P. S. (2013). Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. *UNICIÊNCIAS*, v. 17, n. 1, p. 41-46, Dez. 2013.
- Chu, E.Y., et al. A cultura da pimenta do reino. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -EMBRAPA: 2.ed., 2006.
- Costa J.G.M., Santos P.F., Brito S.A., Rodrigues F.G.G., Coutinho H.D.M., Botelho M.A. & Lima S.G. (2010). Composição Química e Toxicidade de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Frente a Larvas de *Aedes aegypti* L. *Latin American Journal of Pharmacy*. v. 29. n. 3, p. 463-467.
- Cunha, A. P. M. A.; Roque, O. L. R.; Nogueira, M. T.; Plantas aromáticas e óleos essenciais composição e aplicação. Coimbra: fundação calouste gulbenkian, 2012. 545 p.
- Dong, H.; Xiang, Q.; Gu, Y.; Wang, Z.; Paterson, N. G.; STansfeld, P. J.; He, C.; Zhang, Y.;Wnag, W.; Dong, C. Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *NATURE*



International weekly journal of Science. V. 511, p. 52-56, 2014.

Girard, E. A.; Koehler, H. S.; Péllico Netto, S. (2007). Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) LANDRUM). *Rev. Acad., Curitiba*, v. 5, n. 2, p. 147-165.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. Rio de Janeiro: IBGE, v.26 n.1 p.1-83. Janeiro. 2013.

Kim, J.M.; Marshall, M. R.; Cornell, J.A; Preston, J.F.; Wei, C. I. (1995) Antibacterial Activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. *Journal of Food Science*, v.60, n.6, p.1364-68.

Koketsu, M. Gonçalves, S. L. Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor. Rio de Janeiro, EMBRAPA-CTAA. 1991, 24p

Leal, P.F. Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

Lima, E. O. (2002). Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; Calixto, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, p. 482-501.

Luiz, J.M.Q.; Morais, T.P.S.; Blank, A.F.; Sodré, A.C.B.; Oliveira, G.S. (2009). Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjeriço sob doses de cama de frango. *Horticultura Brasileira*, v. 27, n.3, jul/set:349-353.

Luna, D. D.; , A.F. Santos, M.R.F. De Lima, M.C. De Omena, L.W. Bieber, A.E.G.S. Ana, A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil, 97 (2005) 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.004>.

Machado, B. F. M. T.; Fernandez Júnior, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos acadêmicos. Tubarão*, vol. 3, n. 2, pp. 105-127, 2011.

McLaughlin, J.L.; Chang, C.J.; Smith, D.L. (1991). "Bench - top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, p. 383-409. In: Rahman, A. (Org.). *Studies in Natural Product Chemistry*, 9th ed., Elsevier, Amsterdam.

Melo, E.C.; Radünz, L. L.; Melo, R. C. A. (2004). Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais: revisão. *Engenharia na Agricultura, Viçosa, MG*, v.12, n.4, 307-315.

Melo, A. M. De, Cristina, R., Barbi, T., Felipe, W., Souza, D., Costa, L., ... Solange, Q. (2020). Microencapsulated lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil: A new source of natural additive applied to Coalho cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*,



(January), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14783>

Meyer, B. N., N. R. Ferrigni; J. E. Putnam; L. B. Jaconsen; D. E. Nicholas; J. L. Mclau, meyer. (1982), A convenient general bioassays for active plant tituents. *Journal of Medicinal Planyt Research*. 45, 31–34.

Ministério da agricultura e do abastecimento - MAPA. Instrução normativa nº 10 de 15 de maio de 2006. Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade de Pimenta-do-reino.

Mobot. (2005). Manual de plantas. Disponível em: <<http://www.mobot.org/manual.plantas/lista.html>>. Acesso em: 05 de setembro, 2019.

NCCLS, Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, 2005.

Oetting, L.L. Extratos vegetais como promotores do crescimento crescimentos de leitões recém-desmamados. Tese de doutorado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, p.22, 2005.

Orav, A.; Stulova, I.; Kailas, T.; Müürisepp, M. (2004). Effect of storage on the Essential Oil Composition ok *Piper nigrum* L. fruites of different ripening states. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. Vol 52. n 2582.

Pissinate, K. (2006) Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Pereira, A. A. (2006). Efeito inibitório de óleos essencial sobre o crescimento de bactéria e fungos. Lavras. Dissertação, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, 58p.

Ristori, C. A., Pereira, M. A. S; Gelli, D. S. (2002). O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação in vitro com *Salmonella Rubislaw*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 62, n. 2, p. 131-133.

Romero A. L.; Romero, R. B; Silva, E. L.; Diniz, S. P. S. S.; Oliveira, R. R.; Vida, J. B. (2012). Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* Sobre Fungos Fitopatogênicos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. v. 14, p. 231-235.

Santos, T. G.; Rabelo, R. A. (2012). Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. *Quim. Nova*, v. 35, n. 3, 477-481.

Silva, E.V.C.; Silva, G.F.; Joele, M.R.S.P. (2009). Avaliação da utilização de óleo essencial e oleorresina de Pimenta-do-Reino (*Piper nigrum* L.) em salsicha de frango. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v.1, n.2, p.48-60.

Silva, A. A.; Anjos, M. M.; Ruiz, S. P.; Panice, L. B.; Mikcha, J. M. G.; Manchinski Júnior, M.; Abreu



- FILHO, B. A. (2015). Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. B.CEPPA, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 111-117.
- Simões, C.M.O. & Spitzer, V. Óleos essenciais. Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, 1999, p. 387- 415.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (1999). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. da UFSC.
- Souza Filho, A. P. S.; Bayma, J. C.; Guilhon, G. M. S. P.; Zoghbi, M. G. B. (2009). Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. Planta Daninha, Viçosa, v. 27, n. 3, p.499-505.
- Stoyanova, A.; Denkova, Z.; Nevov, N.; Slavchev, A.; Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Lien, H. N.; Schimidt, E.; Geissler, M. (2006). C₂H₂F₄-Oleoresins of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) and Ginger (*Zingiber officinale* (L.) Rosc.) from Vietnam: Antimicrobial Testings, Gas Chromatographic Analysis and Olfactoric Evaluation. Electronic. Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, v. 5, n. 6.
- Trajano, V. N.; Lima, E. O.; Souza, E. L.; Travazos, A. E. R. (2009) Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, p. 542-545.
- Yazgan, H., (2020). Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent, LWT - Food Science and Technology, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109669>.
- Zacarão, P.C; Piletti, R.R. Estudo da propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais de alho (*allium sativum*), pimenta do reino (*piper nigrum*) e pimenta rosa (*schinus molle*) para aplicação em cortes de frango temperados. Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2013. Disponível em: <<http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/1808/1/Paula%20Choseck%20Zacar%C3%A3o.pdf>>. Acesso em: 10 de maio, 2020.

COMO CITAR ESTE ARTIGO:

Melo, A. M. de, Silva, E. O., Marques, D. I. D., Quirino, M. R., Sousa, S. de (2020). Extração, identificação e estudo do potencial antimicrobiano do óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), biomonitorado por *Artemia salina* Leach. *Holos*. 37(1), 1-16.

SOBRE OS AUTORES

A. M. DE MELO

Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. E-mail: anely-maciel@live.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7795-6682>



E. O. SILVA

Mestranda do Programa de Pós Graduação em Tecnologia Agroalimentar do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba. E-mail: erivane.silva@yahoo.com.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6068-9255>

D. I. D. MARQUES

Técnico do Laboratório da Química do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba. E-mail: diego_idm@yahoo.com.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6477-1643>

M. R. QUIRINO

Professor do Departamento de Ciências Básicas e Sociais do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba. E-mail: maxrocha@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2873-261X>

S. DE SOUSA

Professora do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba. E-mail: solange_ufpb@yahoo.com.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8587-4828>

Editor(a) Responsável: Francinaide de Lima Silva Nascimento

Pareceristas *Ad Hoc*: ARIVONALDO DA SILVA E SOFIA SUELY BRANDÃO

