



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS I**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE ODONTOLOGIA**

**LARISSA RODRIGUES APOLINÁRIO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXIDEZ DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Schinus terebinthifolius* Raddi**

**CAMPINA GRANDE - PB**

**2015**

**LARISSA RODRIGUES APOLINÁRIO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXIDEZ DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Schinus terebinthifolius* Raddi**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em forma de artigo científico ao Curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, como requisito parcial para obtenção do título de cirurgiã-dentista.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edja Maria Melo de Brito Costa

**CAMPINA GRANDE - PB**

**2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586a Silva, Larissa Rodrigues Apolinário da.  
Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano e toxidez do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi [manuscrito] / Larissa Rodrigues Apolinario da Silva. - 2015.  
23 p.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.  
"Orientação: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia".

1. Plantas medicinais. 2. Ação antimicrobiana. 3. *Candida albicans*. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

LARISSA RODRIGUES APOLINÁRIO DA SILVA

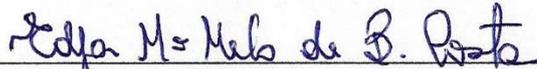
AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXIDEZ DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Schinus terebinthifolius* Raddi

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em forma de artigo científico ao Curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, como requisito parcial para obtenção do título de cirurgiã-dentista.

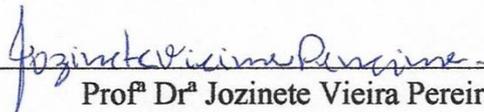
Área de concentração: Microbiologia

Aprovada em: 09 / 09 / 2015.

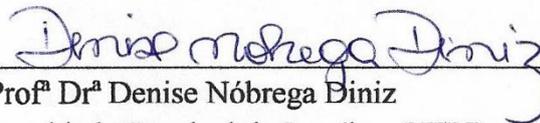
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Edja Maria Melo de Brito Costa (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



Profª Drª Jozinete Vieira Pereira  
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



Profª Drª Denise Nóbrega Diniz  
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida, por ser meu verdadeiro Guia e Protetor diário, e pelas infinitas bênçãos derramadas no meu caminho, e à Nossa Senhora, minha Mãe do Céu, por me ouvir, falar ao meu coração e ser minha intercessora junto ao Pai.

À minha amada família, forte pilar em minha vida. À minha mãezinha, Giselda Rodrigues, por ser esse exemplo constante de fé e amor inesgotável. Agradeço por todo carinho, dedicação, por me ajudar a realizar os meus sonhos e ser peça fundamental na construção do meu futuro. Ao meu pai, Janildo Apolinário (*in memoriam*), meu Anjo no Céu, que sempre me ensinou, com suas atitudes, a ser uma pessoa melhor e nunca mediu esforços para me fazer feliz. A lembrança da sua alegria me dá coragem e ânimo para seguir em frente. Sei que estaria muito orgulhoso com essa conquista. À minha irmã, Valeska, pela fiel amizade, parceria e apoio constante. A vocês devo tudo o que sou. Amo-os imensuravelmente! Essa vitória é nossa!

Ao meu noivo, Tales Abreu, que me acompanhou durante toda essa trajetória e foi meu grande incentivador. Obrigada pelo amor, companheirismo, cuidado e por sempre acreditar na minha capacidade de alcançar este objetivo.

Às minhas amigas da escola (Laryssa, Laís, Sonalle, Luanna e Mariana), que mesmo com a distância se fazem sempre presentes nas minhas realizações.

Aos amigos que conquistei durante esta caminhada pela Universidade, que foram responsáveis pelo meu engrandecimento pessoal, em especial: Alencar Neto, Bruno Alisson, Andrea, Niebla, Renan, Rafael, Érika, Moangella, Carlos, Kivia, Rayssa, Cibelle, Lillian, Rayane, Ingrid, Roberta, Liege, Eloiza, Ariana, Verônica. Sentirei saudades do convívio diário.

Às meninas do Grupo de pesquisa (Priscilla, Cibelle, Carol, Eveline, Renally e Érika), pela ajuda, amizade e companheirismo.

À minha querida orientadora, Prof<sup>ra</sup> Edja Maria, pelo incentivo e por ter me acolhido com carinho na pesquisa. Obrigada pela confiança no meu trabalho, paciência e pelos valiosos ensinamentos. Minha eterna admiração.

A todos os Mestres que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante esses cinco anos de curso, em especial às Prof<sup>as</sup> Denise e Jozinete, por terem aceitado fazer parte da minha banca. Vocês são profissionais admiráveis. Obrigada por tudo!

A todos os funcionários da UEPB pela generosidade e auxílio.

Agradeço ao CAPES/CNPq pelo apoio financeiro.

Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano e toxidez do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi

Larissa Rodrigues Apolinário da Silva\*

**RESUMO:** A pesquisa de materiais vegetais com ação antimicrobiana representa uma alternativa promissora no combate a patógenos orais, em razão do surgimento de espécies multirresistentes a drogas sintéticas. A *Schinus terebinthifolius* Raddi destaca-se em função das propriedades terapêuticas e uso crescente na medicina popular. Estudos das suas propriedades biológicas são necessários para validar a sua eficácia e segurança do uso clínico. O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* da *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a cepas padrão, sua toxidez e perfil fitoquímico. O potencial antimicrobiano do óleo essencial dos frutos verdes da *S. terebinthifolius* foi avaliado por meio da microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), frente as cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. A toxidez do óleo essencial foi analisada pelo método da hemólise. A análise fitoquímica foi realizada por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM). O óleo essencial apresentou moderado potencial antifúngico frente à *Candida albicans* (CIM = 1 mg/mL), e nenhuma atividade contra as cepas bacterianas, até a concentração de 2 mg/mL. O óleo essencial da *S. terebinthifolius* não apresentou ação hemolítica até a concentração de 8 mg/mL. Nas amostras mais concentradas, a partir de 16 mg/mL, foi observada a hemólise das células, sendo considerado um risco tóxico para a membrana das hemácias. A CG-EM identificou a predominância de terpenos, dos tipos alfa e beta-felandreno. O óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresenta potencial antifúngico para a *C. albicans*, sendo inócuo para as hemácias até a concentração de 8 mg/mL. Estes achados impulsionam a realização de outros métodos pré-clínicos, a fim de se verificar sua eficácia na candidose oral.

**Palavras-Chave:** *Schinus*; Plantas medicinais; Produtos com ação antimicrobiana; *Candida albicans*

## 1 INTRODUÇÃO

A identificação de substâncias vegetais com ação antimicrobiana representa uma alternativa para o controle e/ou tratamento de infecções em humanos. Essa busca tem sido motivada, especialmente, em função da resistência microbiana (ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2013; CASTRO; LIMA, 2010; MENEZES et al., 2009) que tem resultado em prejuízos a saúde humana. O uso indiscriminado de antibióticos em alguns países da Europa resultou em resistência de populações bacterianas, causando assim um grave problema de saúde

---

\*Aluna de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual da Paraíba, Campus I.

email: larissarodrigues\_@hotmail.com

pública e tornando-se uma das maiores causas de falha no tratamento de doenças infecciosas (COLE et al., 2014).

As plantas medicinais são introduzidas neste contexto, por serem amplamente utilizadas como agente antimicrobiano na medicina tradicional. Os resultados terapêuticos encontrados pela população são resultantes da ação de compostos ativos, conhecidos como metabólicos secundários. Considerando as propriedades biológicas das plantas medicinais, novas formas terapêuticas e estratégias antimicrobianas são propostas na tentativa de minimizar a ocorrência de infecções resistentes ao tratamento convencional (CASTRO; LIMA, 2010; KUREK et al., 2012). Apesar do aumento de estudos nesta área, os dados disponíveis mostram que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas para fins terapêuticos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Dentre as plantas nativas atualmente estudadas, destaca-se a *Schinus terebinthifolius* Raddi, em função do seu uso na medicina tradicional (LUCENA et al., 2006; SANTOS et al., 2009).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma árvore perene, de pequeno a médio porte, pertencente à família Anacardiaceae (PAULO et al., 2009). Nativa da costa do Brasil, foi introduzida em países da América do Sul e Central, podendo ser encontrada também em regiões tropicais e subtropicais da América do Norte, do continente Africano e em parte da Europa Mediterrânea e do Sul da Ásia (AFFONSO et al., 2012; BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007). Apresenta muitos nomes populares incluindo aroeira-da-praia, pimenta-rosa, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e aroeira-mansa (MENDONÇA; SILVA-MANN; RABBANI, 2014). A *S. terebinthifolius* apresenta frutos do tipo drupa, globóides, aromáticos e com coloração vermelha quando maduros, mas inicialmente são verdes (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2005).

Na medicina popular são descritas diversas aplicações de uso das partes desta planta (folhas, frutos e cascas), como adstringente, antidiarreica, depurativa, antipirética (PAIVA; ALOUFA, 2009), antioxidante, cicatrizante, antitumoral (GILBERT; FAVORETO, 2011) e hemostática, utilizada também no tratamento de doenças venéreas, reumatismo e gengivite (AFFONSO et al., 2012). O óleo extraído da casca é utilizado para o tratamento de febre, hemoptises, afecções uterinas, tumores e doenças da córnea (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2004; MOUSTAFA et al., 2007). Para o óleo essencial dos frutos atribui-se atividade diurética, antimicrobiana em bactérias gram-positivas e antiinflamatória por inibição da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PIRES et al., 2004). Devido à alta concentração de monoterpenos voláteis dos seus óleos essenciais é usada no tratamento de

problemas respiratórios (BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007) e micoses, como infecções por *Candida* (LIMA et al., 2006). O óleo essencial também tem uso comprovado nas indústrias alimentícias (MENDONÇA; SILVA-MANN; RABBANI, 2014).

O fruto da *S. terebinthifolius* possui de 5,50 a 8,41% de óleo essencial. Este óleo apresenta composição química predominante de monoterpenos (85,1%), sendo os mais abundantes  $\delta$ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), alfa-felandreno (12,60%), alfa-pineno (12,59%), mirceno (5,82%) e o-cimeno (3,46%), seguido pelos sesquiterpenos (5,34%) *trans*-cariofileno, Y-muuruleno, *E,E*-a-farneseno,  $\delta$ -cadineno e epi-a-cadinol (COLE et al., 2014).

Essas substâncias voláteis do óleo essencial têm importância nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores (CALIXTO, 2001).

O óleo essencial das folhas da *S. terebinthifolius* mostrou atividade antibacteriana contra o *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*, bem como atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* e *Candida albicans* (El MASSRY et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Bendaoud et al. (2010) identificaram uma marcante atividade antioxidante e citotóxica *in vitro* do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* contra células de câncer de mama humano. Estes resultados sugerem que o óleo essencial de *S. terebinthifolius* pode ser uma fonte promissora de compostos ativos para terapias inovadoras e/ou estratégias preventivas contra o câncer (CARVALHO et al., 2013). Em relação a atividade antimicrobiana, o óleo essencial extraído dos frutos maduros de *S. terebinthifolius* apresentou atividade fungitóxica *in vitro* contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. A inibição do crescimento do fungo foi diretamente proporcional à concentração do óleo, onde a maior concentração utilizada (0,50%) apresentou inibição de 79,07%. Esta análise foi realizada pelo método da difusão em ágar, considerando o índice de velocidade de crescimento miscelial (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013). As atividades larvicida, inseticida e repelente do óleo essencial obtido dos frutos maduros da *S. terebinthifolius* foram evidenciadas contra o *Aedes aegypti* (COLE, 2008), além da atividade antibacteriana contra *E. coli*; *Bacillus sp.*; *Pseudomonas sp.*; *Klebsiella oxytoca*; *Corynebacterium sp.*; *Nocardia sp.*; *S. aureus*; *Enterobacter sp.*; *Enterobacter agglomerans* e *Streptococcus* grupo D (COLE et al., 2014).

Sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população na forma de chás e infusões não são suficientemente estudadas quanto à presença de substâncias citotóxicas que podem causar efeitos adversos e consequentemente danos à saúde (BAGANTINI; SILVA;

TEDESCO, 2007). Os óleos puros frequentemente apresentam toxicidade elevada tanto que, dentro das recomendações de uso, encontram-se as pequenas dosagens e seus efeitos tóxicos podem ser decorrentes de intoxicações agudas ou crônicas (CARDOSO et al., 2009).

Portanto, além de estudos que comprovem o potencial antimicrobiano e outras propriedades biológicas das plantas, a investigação da sua toxidez é extremamente necessária para se validar a eficácia e segurança destes recursos vegetais empregados terapêuticamente pela população (VIEIRA et al., 2014). Existem vários modelos toxicológicos *in vitro* para analisar a segurança toxicológica de uma substância, onde são utilizados diferentes modelos celulares, incluindo fibroblastos, queratinócitos e hemácias (CRUZ et al., 2010).

O presente estudo objetivou avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a cepas padrão de bactérias e levedura, e sua toxidez, através do teste da hemólise.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Locais de realização da pesquisa**

Os ensaios da atividade antimicrobiana e toxidez foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) pertencente ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). A caracterização fitoquímica foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP - SP), através do programa PROCAD/Casadinho (Capes/CNPq).

### **2.2 Material Vegetal**

Foram utilizados frutos verdes da *Schinus terebinthifolius* Raddi, coletados na região do semiárido paraibano, no município de Campina Grande (7°12' 35" S, 35° 54' 57"W), sob orientação de um botânico. Os frutos foram limpos, acondicionados em recipientes plásticos e estocados em geladeira convencional até o momento da extração do óleo. O espécime testemunho encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba sob o registro nº 486/ACAM.

## 2.3 Preparo do Material Vegetal

O óleo essencial da *S. terebinthifolius* foi extraído de frutos verdes da planta pelo método da hidrodestilação, utilizando-se um aparelho tipo Clevenger.

Cinquenta gramas da amostra foram colocados em balão de 500 mL de fundo redondo, juntamente com 200 mL de água destilada. Com o auxílio de uma manta, foi realizado o aquecimento, em constante ebulição. Após 2 horas, o óleo foi removido, colocado em frasco de vidro e estocado em freezer comercial (-2°C) até o momento de sua utilização.

## 2.4 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos testes foram o Gram-positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e os Gram-negativos *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

## 2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

### 2.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método da microdiluição

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, proposta pelo CLSI (2010). O teste foi realizado em microplacas de 96 poços contendo 100 µL/poço do meio de cultura específico (Müeller-Hinton – para bactérias, e meio RPMI – 1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) – para a levedura). Foram acrescidos 100 µL do óleo essencial na concentração de 4 mg/mL no primeiro poço da coluna, e em seguida, realizou-se diluições seriadas, de modo que 100 µL do conteúdo do primeiro poço foram homogêneos e transferidos para o seguinte, obtendo-se concentrações decrescentes entre 2000 e 15,62µg/mL. Os 100 µL finais foram desprezados. Posteriormente, 10 µL do inóculo bacteriano ( $1,0 \times 10^6$  UFC/mL) e da levedura ( $2,5 \times 10^3$  UFC/mL) foram adicionados aos poços e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. A Clorexidina a 0,12% (Sigma-Aldrich) e a nistatina (Sigma-Aldrich) foram utilizados como controles positivos e o Tween 80 foi usado como controle negativo. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento microbiano visível, que foi confirmada com 0,01% de resazurina (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, EUA) para as bactérias e por mudança de cor do meio RPMI 1640 (rosa para amarelo) para a levedura. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi avaliada de acordo com a classificação de Aligianis et al (2001), empregando-se os seguintes critérios: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1600 µg/mL.

### ***2.5.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)***

A atividade bactericida ou fungicida foi analisada apenas com as amostras que apresentaram CIM até 1000 µg/mL por meio do plaqueamento por superfície do material do poço correspondente à CIM e concentrações anteriores a este, em meio de cultura específico. A CBM/CFM foi definida como a concentração capaz inibir o crescimento microbiano (CLSI, 2005, 2008).

## **2.6 Ensaio da toxidez**

### ***2.6.1 Hemólise***

Preparou-se uma suspensão de hemácias 5% em solução salina 0,9%. Em seguida, 2 mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 2 mL do óleo essencial dissolvido em Tween 80, em diferentes concentrações: 1, 2, 4, 8 e 16 mg/mL. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (rotações por minuto), durante 10 minutos e realizada a leitura visual, levando-se em consideração a quantidade de hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise), conforme classificação Luize et al. (2005). Essa leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm) (Shimadzu® UV mini – 1240), utilizando como branco a solução salina 0,9% para confirmar os resultados da leitura visual. Foi utilizado como controle negativo a suspensão de hemácias 5% em solução salina 0,9% e como controle positivo a suspensão de hemácias 5% com o Líquido de Turk.

## 2.7 Caracterização Fitoquímica

### 2.7.1 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa

Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM). Aliquotas de 400 µL (micropipeta Eppendorf, Research plus, 100-1000 µL) da amostra foram colocados dentro de "vials" de vidro e adicionados 1 mL de uma solução de trimetilsilil para silanização. A amostra foi analisada em um cromatógrafo a gás (QP 2010 Plus, Shimadzu Co.) acoplado a um espectrômetro de massa, equipado com uma coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, Palo Alto, CA) 30 m x 0,25 x 02,5µm e um detector operando no modo "scanning" (m/z 40-400). A programação de temperatura foi de 60 °C (3 minutos) 240 °C (15 minutos), com um incremento de 3 °C/min. A amostra (0,5 µL) foi injetada por um auto-injetor, utilizando a técnica de injeção "splitless". A integração foi feita através do software específico do equipamento. Terpenos e sesquiterpenos foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos metilados e eluídos nas mesmas condições. Os outros compostos químicos foram identificados por comparação com os dados do espectro de massas da biblioteca do equipamento (Nist- 11).

## 3 RESULTADOS

O óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresentou atividade antimicrobiana apenas frente a *C. albicans* (Tabela 1), e produziu hemólise a partir da concentração de 16 mg/mL (Tabela 2).

**Tabela 1:** Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi, de acordo com o microrganismo.

MICROORGANISMO	<i>S. terebinthifolius</i>	
	CIM (µg/mL)	CBM/CFM (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	>2000	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	>2000	–

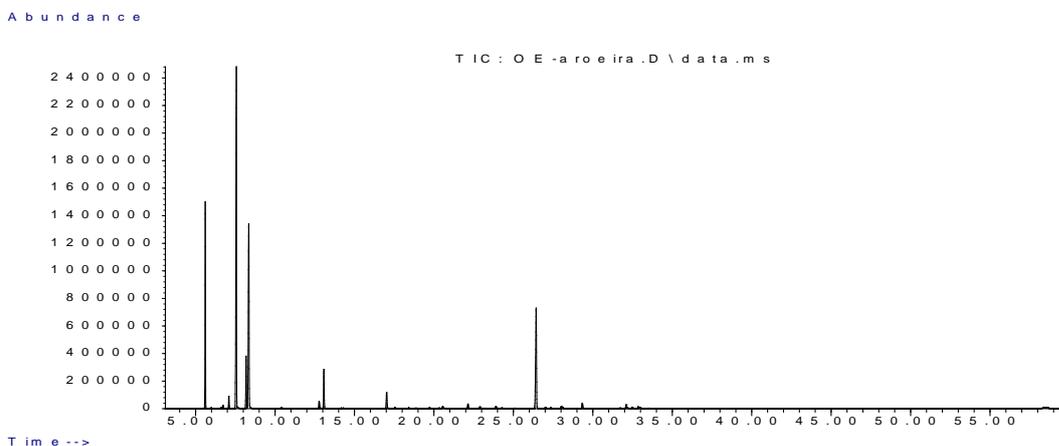
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	>2000	–
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000	1000

**Tabela 2:** Distribuição dos valores percentuais da hemólise produzida pelo óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi, de acordo com as concentrações.

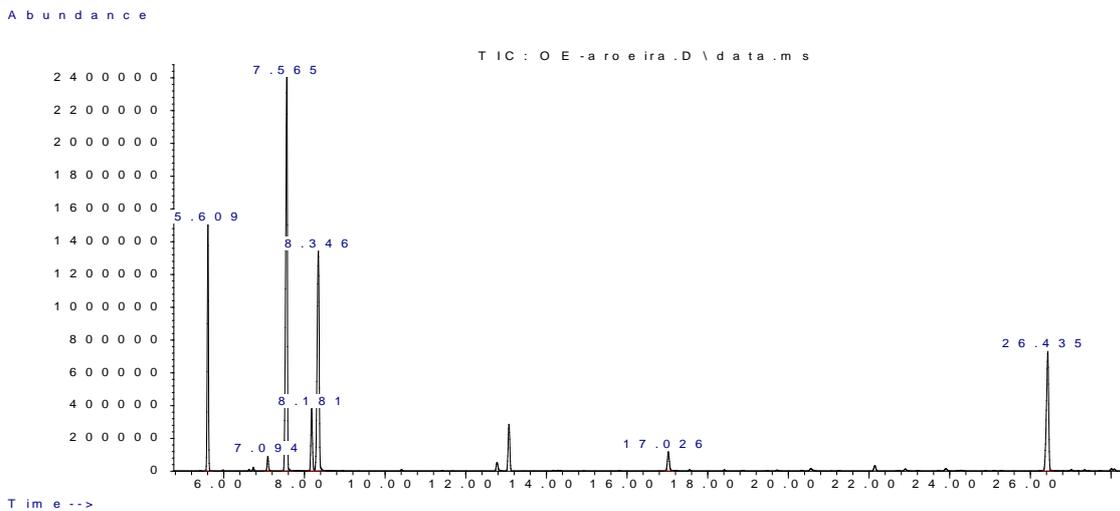
CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO					
	16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
<b>Amostra 1</b>	0,957	x	0,202	0,106	0,065
<b>Amostra 2</b>	1,053	0,857	0,242	0,155	0,181
<b>Amostra 3</b>	x	0,896	0,256	0,375	0,086
<b>Média</b>	<b>1,005</b>	<b>0,876</b>	<b>0,233</b>	<b>0,212</b>	<b>0,110</b>
<b>Porcentagem da hemólise</b>	53%	46%	12,38%	11,26%	5,84%
<b>Classificação da hemólise</b>	++	+	-	-	-

A partir do gráfico 1 podemos observar o tempo de retenção de cada amostra até formar o pico referente aos constituintes químicos de interesse. Os compostos foram identificados no intervalo entre cinco e vinte e sete minutos. Esse fragmento foi expandido e gerou-se um novo gráfico (Gráfico 2). Por conseguinte, os dados obtidos foram cruzados com o banco de dados do equipamento resultando na identificação de sete analitos, elencados na tabela 3.

**Gráfico 1:** Cromatograma do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi



**Gráfico 2:** Cromatograma expandido (5-27 min) do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi



**Tabela 3:** Analitos identificados no óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi

tr (min)	IR <sup>(a)</sup>	Identificação	% rel. <sup>(b)</sup>
<b>5,61</b>	933	alfa-pineno	15,91
<b>7,10</b>	991	beta-mirceno	1,07
<b>7,57</b>	1007	alfa-felandreno	37,05
<b>8,18</b>	1025	para-cimeno	5,35
<b>8,35</b>	1029	beta-felandreno	24,10
<b>17,02</b>	1252	n.i. <sup>(c)</sup>	2,05
<b>26,43</b>	1481	germacreno D	14,47

Notas: a) índice de retenção; b) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; c) não identificado.

#### 4 DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da *S. terebinthifolius* frente a *C. albicans* foi classificada como moderada (CIM = 1000 µg/mL) e para as bactérias como fraca (CIM > 2000 µg/mL), conforme a classificação de Aligianis et al. (2001). Destaca-se o resultado encontrado frente a *C. albicans*, por ser a espécie mais associada à etiologia da candidose oral, uma doença oportunista que acomete mais comumente indivíduos imunocomprometidos

(CORRÊA; ANDRADE, 2006; TEN-CATE et al., 2009). A nistatina constitui-se um dos mais importantes agentes ativos contra infecções fúngicas da cavidade oral (PÁL et al., 2013), porém, já são observados casos de resistência de cepas de *C. albicans* frente a este fármaco (PÉREZ et al., 2011). O registro de infecções causadas pela *Candida* tem exibido uma crescente resistência aos antifúngicos, levando a falhas no tratamento e a infecções recidivantes (LIMA et al., 2014).

Apesar dos resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial da *S. terebinthifolius* terem sido negativos, o seu potencial antimicrobiano foi avaliado anteriormente contra algumas espécies de bactérias e leveduras, apresentando resultados positivos contra *Staphylococcus aureus* (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005; DOURADO, 2012), *Escherichia coli* (DOURADO, 2012), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus casei* (ALVES et al., 2009) e *C. albicans* (ALVES et al. 2009; FREIRES et al. 2011).

Esses resultados são ainda incipientes, no entanto, o óleo essencial da *S. terebinthifolius* pode constituir uma fonte promissora para o desenvolvimento de produtos antimicrobianos para o controle e/ou tratamento, especialmente, da candidose oral (PÉREZ et al., 2011).

As cepas bacterianas *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) testadas no experimento de Melo et al. (2014), pelo método de difusão em disco, também não foram sensíveis ao óleo dos frutos da *S. terebinthifolius*. Os autores adicionaram, sobre cada disco de papel, 20 µl do óleo essencial da *S. terebinthifolius* na concentração de 100 mg/mL. Os diâmetros dos halos de inibição foram menores que 8 mm e, dessa forma, o óleo não apresentou atividade antimicrobiana avaliada por esse método.

Diferente do trabalho de Dourado (2012), que mostrou efetividade frente a um amplo espectro de cepas patogênicas, incluindo a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e do trabalho de Cole et al. (2014) cujos resultados foram positivos para *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Corynebacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus* sp., *Nocardia* sp. e *Streptococcus* do grupo D.

A diferença de resultados pode ser atribuída a diversos fatores. Um deles é inerente a amostra estudada. Dependendo das condições de cultivo, ambientais, características genéticas e parte da planta analisada os seus constituintes ativos extraídos podem variar, o que pode interferir diretamente nas suas propriedades biológicas.

Por exemplo, o óleo essencial no estudo de Cole et al. (2014) e Dourado (2012) foi extraído de frutos maduros, cuja composição química foi diferente daquela encontrada no óleo deste estudo, extraído de frutos verdes. Cole et al. (2014) encontraram dezessete compostos, dentre os quais, muitos não foram identificados no presente estudo, como:  $\delta$ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), mirceno (5,82%), o-cimeno (3,46%), *E,E*- $\alpha$ -farneseno (1,77%), *trans*-cariofileno (1,77%),  $\delta$ -cadineno (1,32),  $\gamma$ -muuruleno (1,29%), isoterpinolene (1,02%), beta-pineno (0,69%), sabineno (0,61%), epi- $\alpha$ -cadinol (0,60%) e carvacrol (0,30%).

Outro aspecto que deve ser considerado é o método utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana. Foi verificado que dentre as técnicas utilizadas, a técnica de microdiluição em caldo é a que apresenta melhor sensibilidade (ALVES et al., 2008).

Barbosa et al. (2007), a partir da análise do óleo essencial da folha e do fruto da *S. terebinthifolius*, elencou a presença, dentre outros compostos, do alfa-pineno (14,31%), do alfa-felandreno (12,94%) e do beta-felandreno (18,51%), os quais foram identificados neste estudo, porém em diferentes concentrações. Comparando os componentes dos óleos de frutos maduros e verdes, Barbosa et al. (2007) identificaram uma certa variação, predominando no óleo dos frutos verdes os sesquiterpenos alfa-cadinol, alfa-cadineno, epi-alfa-muurolool. Já nos frutos maduros foram identificados alfa-cadinol, elemol e germacreno-D, como predominantes. Observa-se que a proporção dos compostos presentes nos óleos pode variar de acordo com o estado de maturação do fruto (MELO et al., 2014).

Diante destes resultados, observa-se que a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente. A variação química com predomínio de diferentes compostos no óleo essencial obtido a partir de uma mesma espécie coletada em locais diferentes (ecotipos) é frequentemente devido à alta complexidade química dos óleos essenciais. Fatores geográficos (localização) e ecológicos (habitat) também devem ser considerados. Além de todos esses fatores, deve-se levar em conta a variabilidade genética das plantas, que está intimamente relacionada com a qualidade dos óleos essenciais, e é expressa através de quimiotipos (ROVEDA et al., 2010).

Os óleos essenciais não são substâncias puras, sendo uma mistura de vários compostos orgânicos voláteis, complexas, presentes em diferentes concentrações, que variam de espécie para espécie vegetal. Segundo Cezarotto (2009), as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais parecem estar associadas a altos teores de hidrocarbonetos monoterpênicos, em especial ao alfa-pineno, presente na amostra analisada.

A atividade antimicrobiana destes compostos provavelmente se deve a capacidade de destruir a integridade celular, inibir a respiração e processo de transporte iônico, além da

capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular (COX et al, 2000; SIQUEIRA et al; 1985).

O germacreno-D, encontrado nesta investigação, constitui um dos componentes majoritários de óleos essenciais com atividade antimicrobiana, presente em diferentes espécies vegetais (BIAVATTI *et al.*, 2001; GONZAGA *et al.*, 2003; IACOBELLIS *et al.*, 2005). No entanto, o composto isolado pode não ser responsável pela atividade antimicrobiana. Devido a lipofilia de hidrocarbonetos de estrutura terpênica, este composto pode ser uma variável importante na composição de óleos essenciais com vertentes antimicrobianas, uma vez que a sua partição nos lipídeos da membrana celular aumenta a permeabilidade desta e facilita a penetração de agentes antimicrobianos no interior celular. Esta observação reforça a importância das interações positivas entre as moléculas ativas presentes numa amostra vegetal (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003).

Deste modo, os ensaios de toxidez são indispensáveis para se analisar os reais benefícios e riscos dos compostos presentes nas plantas. O teste para verificação da ação hemolítica *in vitro* vem sendo empregado como uma metodologia de triagem para diversos agentes tóxicos (PEQUENO; SOTO - BLANCO, 2006). É devido a estes fatores que o teste da hemólise se fez necessário para avaliar se, além da ação antimicrobiana, o óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresenta caráter tóxico para a membrana das hemácias.

Neste estudo, o óleo essencial da *S. terebinthifolius* não apresentou ação hemolítica até a concentração de 8 mg/mL, visto que a solução salina contendo as hemácias e o óleo essencial permaneceu límpida após a centrifugação, ou seja, as hemácias permaneceram íntegras no fundo dos tubos, com a formação de um precipitado de células, sem que tenha havido a lise das mesmas. Nas amostras mais concentradas, a partir de 16 mg/mL, foram observadas a hemólise das células, sendo considerada a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50), ou seja, capaz de hemolisar 50% de uma suspensão a 4% de eritrócitos (SCHULZ; PEREIRA; BATISTA, 2005).

Estudos *in vitro*, principalmente avaliando atividade antimicrobiana, apresentam-se como preliminares numa sequência desde ensaios microbiológicos até a fase clínica (FREIRES et al., 2011). Apesar da *S. terebinthifolius* já ser utilizada na medicina tradicional, os resultados obtidos nesse estudo referentes à sua ação antimicrobiana, toxidez e perfil fitoquímico impulsionam a realização de outros métodos não-clínicos, levando-se em consideração suas atividades terapêuticas na Odontologia, a fim de se definir o mecanismo de ação no organismo, o tempo ideal de tratamento, possíveis riscos e eficácia no controle de patógenos orais.

## 5 CONCLUSÕES

O óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresentou efeito inibitório à cepa de *C. albicans* e nenhuma atividade para linhagens bacterianas até a concentração de 2 mg/mL, com ação hemolítica efetiva a partir de 16 mg/mL. Estes achados reforçam a importância das indicações terapêuticas da planta como método alternativo, mas sugerem a realização de outros métodos não-clínicos, a fim de se definir o mecanismo de ação no organismo, seus possíveis riscos e eficácia no controle de patógenos orais.

### *In vitro* EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL POTENTIAL AND TOXICITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Schinus terebinthifolius* Raddi

#### ABSTRACT

The research involving plant materials with antimicrobial activity is a promising alternative in the fight against oral pathogens, due the emergence of multidrug-resistant species to synthetic drugs. The *Schinus terebinthifolius* Raddi stands out due the therapeutic properties and the increasing use in folk medicine. Studies of its biological properties are needed to validate the efficacy and safety of its clinical use. This study evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of *Schinus terebinthifolius* Raddi against standard strains, its toxicity and phytochemical profile. The antimicrobial potential of the essential oil from unripe fruits of *S. terebinthifolius* was assessed by microdilution broth, with determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and *Candida albicans* ATCC 10231. The toxicity of the essential oil was analyzed by the hemolysis method. Phytochemical analysis was performed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). The essential oil showed moderate antifungal potential for *Candida albicans* (MIC = 1 mg/ml), and no activity against bacterial strains till the concentration of 2 mg/ml. The essential oil of *S. terebinthifolius* showed no hemolytic action until the concentration of 8 mg/mL. In more concentrated samples, from 16 mg/ml, hemolysis of the cells was observed and is considered a toxic hazard to the membrane of erythrocytes. The GC-MS identified the predominance of terpenes, alpha and beta phellandrene types. The essential oil of the *S. terebinthifolius* has potential antifungal for *C. albicans* and is harmless to the red blood cells until the concentration of 8 mg/mL. These findings boost the performance of other nonclinical methods, in order to verify its efficacy in oral candidiasis.

**Keywords:** *Schinus*; Medicinal plants; Products with antimicrobial action; *Candida albicans*

#### REFERÊNCIAS

AFFONSO, C. R. G. et al. Effects of the essential oil from fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) on reproductive functions in male rats. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 23, n. 1, p. 180-185, 2012.

ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem**, v. 49 p. 4168-4170, 2001.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ALVES, P. M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ALVES, L. A. et al. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Acta Odontologica Scandinavica**, p. 1-7, 2013.

ALVES, P. M. et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: Uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 192-196, abr./jun. 2006.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p- 1959-1965, 2007.

BIAVATTI, M. W. et al. **Phytomedicine**, n. 8, 121, 2001.

BENDAOUD, H. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food and Science**, v. 75, p. 466-72, 2010.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, 2003.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais**. Santa Catarina: ARGOS, 2001, p. 297-316.

CARDOSO, M. G. et al. **Óleos essenciais**. Disponível em:  
<[http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol\\_62.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_62.pdf)>.

CARLINI, E. A. et al. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Anacardiaceae* (aroeira-do-sertão). **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. bras. plantas med.** v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Antifungal activity of the essential oils from *Eucalyptus globulus* L. on *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP**. v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

CEZAROTTO, V.S. Influência da sazonalidade nos constituintes químicos, atividade antimicrobiana e antioxidante das partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam) Pers E *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Dissertação de Mestrado, Universidade de Santa Maria (RS), Santa Maria, RS, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. CLSI/NCCLS document M100-S15. Wayne, Pennsylvania, 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory – Approved Guideline**. CLSI document C28- A3. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI. v. 28, n. 30, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline – Second Edition**. CLSI document M45-A2, 2010.

COLE, Eduardo Roberto. Estudo Fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Exatas. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2008.

COLE, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Braz. J. Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 821-828, 2014.

CORRÊA, E. M. C.; ANDRADE, E. D. Tratamento odontológico em pacientes HIV/AIDS. **Rev. odonto ciênc**, v. 20, n. 49, p. 281-289, 2006.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Meileuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, n.1, p.170-175, jan. 2000.

CRUZ A.B. et al. Métodos “in vitro” na avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos - Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. p. 174-205.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciênc. agrotec. Lavras**, v. 29, n. 3, p. 617-622, maio/jun., 2005.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.

DOURADO, Massako Takahashi. **Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2012.

EL-MASSRY, K.F. et al. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 5265–5270, 2009.

FREIRES, I. A. et al. Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**, v. 52, n. 20, 2011.

GILBERT, B., FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v. 6, n. 1, dez. 2011.

GONZAGA, W. A. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Med**, v. 69, n. 8, p. 773-775, 2003.

IACOBELLIS, N. S. et al. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, n. 1, p. 57-61, 2005.

KUREK, A. et al. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. **Phytomedicine**, v. 19, n. 6, p. 515-519, 2012.

LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.137–147, 2006.

LIMA, R. F. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-7, 2014.

LUCENA, P. L. H. et al. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cir. Bras**, v. 21, n. 2, 2006.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MARTINEZ, M. J.; GONZÁLEZ, N. A.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana Del *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev. Cubana Plant. Med**, v. 1, n. 3, p. 37-39, 1996.

MARTINEZ-GUERRA, M.J. et al. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal), **Rev. Cubana Plant Med (Habana)**, v. 5, n. 1, p. 23-25, 2000.

MELO, A. D. B. et al. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com vistas ao uso como antimicrobiano para leitões desmamados. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 227-232, jul./set. 2014.

MENDONÇA, V. M.; SILVA-MANN, R.; RABBANI, A. R. C. Prospecção tecnológica de óleo essencial de aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* raddi). **Revista GEINTEC**, v. 4, n. 1, p. 704-715, 2014.

MENEZES, T. O. A., et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MOUSTAFA, A. M. Y. et al. Phytochemical investigation and biological evaluation of *Schinus terebinthifolius*. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. et al. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 150-157, 2013.

PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento in vitro de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Rev. bras. plantas med**, v. 11, n. 3, p. 300-304, 2009.

PÁL, S. et al. Technological and biopharmaceutical optimization of nystatin release from a multiparticulate based bioadhesive drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 258-264, 2013.

PAULO, P. T. C. et al. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn**, v. 19, n. 1A, jan./mar., 2009.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientia e Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 45-48, 2006.

PÉREZ, A. L. A. L. et al. Atividade antifúngica de antissépticos bucais sobre *Candida* spp. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 69-74, 2011.

PIRES, O. C. et al. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta-do-Reino (*Piper nigrum* L.). **Acta Farm Bonaer**, v. 23, p. 176-182, 2004.

ROVEDA, L. M. et al. 2010. Composição química e avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*). Simpósio Brasil-Japão: Sustentabilidade: um desafio da humanidade. Campo Grande, MS.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 321-324, jan./mar. 2009.

SCHULZ, D., PEREIRA, M. A., BATISTA, C. R. V. Obtenção de um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e sua atividade antimicrobiana e hemolítica. **Alim. Nutr.** v. 16, n. 3, p. 233-237, 2005.

SILVA, A. B. et al. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). **Braz J Microbiol**, v. 41, p. 158-163, 2010.

SIQUEIRA, N. C. S.; SILVA, A. A. B.; ALICE, C. B.; NITSCHKE, M. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers e *Baccharis trimera* (Less) DC. (*Compositae*), espécie espontânea no Rio Grande do Sul. **Ver. Bras. Farm**, v. 3, p. 36-39, 1985.

TEN-CATE, J. M. et al. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. **J Dent Res**, v. 88, n. 2, p. 105-115, 2009.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz J Pharm Sci**, v. 42, n. 2, p. 290-306, abr./jun. 2006.

VIEIRA, D. R. P. et al. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 155, p. 1441–1449, 2014.