



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

PRISCILLA GUIMARÃES SILVA

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA *IN VITRO* DA *Schinus terebintifolius* Raddi

**CAMPINA GRANDE - PB
2017**

PRISCILLA GUIMARÃES SILVA

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA *IN VITRO* DA *Schinus terebintifolius* Raddi

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharelado em Odontologia, sob a orientação da Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa

**CAMPINA GRANDE - PB
2017**

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.

S586p Silva, Priscilla Guimarães.

Perfil fitoquímico e atividades antifúngica e citotóxica in vitro da *Schinus terebintifolius* Raddi [manuscrito] / Priscilla Guimarães Silva. - 2017.
38 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia".

1. Plantas medicinais. 2. Aroeira-da-praia. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Citotoxicidade. I. Título.

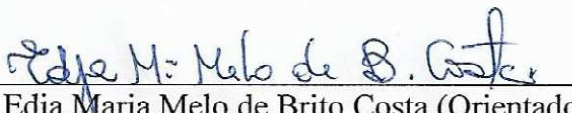
21. ed. CDD 615.321

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO À
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHARELADO EM
ODONTOLOGIA**


PRISCILLA GUIMARÃES SILVA

Trabalho de conclusão de curso aprovado em: 11/04/2017.

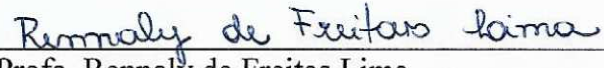
BANCA EXAMINADORA



Profa. Edja Maria Melo de Brito Costa (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Daliana Queiroga de Castro Gomes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Rennaly de Freitas Lima
Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM – CG)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter guiado minha trajetória ao longo do curso, por me manter firme e merecedora de todas as conquistas, proporcionado que tudo acontecesse no momento certo. Nos momentos de dúvidas e inseguranças foi minha fé que me manteve firme para recomeçar, aprender e crescer a cada dia.

Aos meus pais, Amarildo Pedro da Silva e Vanízia Guimarães Silva, por colocarem meu sonho da graduação como prioridade, pelo empenho constante para que minha educação fosse a melhor possível, por serem meus exemplos e pelo amor incondicional; eles que sempre acreditaram no meu potencial e aos quais dedico minha eterna gratidão.

Aos meus avós, pelo cuidado, pelas palavras de carinho e incentivo, por sempre torcer e acreditar nas minhas realizações.

Aos meus tios, em especial a minha tia Valdenia Guimarães, por todo apoio e conselhos, sempre incentivando meu crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora Edja Costa, serei eternamente grata por todas as oportunidades que me concedeu. Acredito que Deus coloca pessoas em nossas vidas que inspiram e rompem com nossas expectativas, quando olho para trás vejo que um dos marcos da minha trajetória foi ser acolhida como sua aluna de iniciação científica e poder conviver com a senhora, um ser humano cativante e repleto de vida, um verdadeiro exemplo de profissional e de mulher, ela que acolhe seu grupo como sua família. Agradeço pelas orientações, conselhos, confiança e tempo dedicados ao meu crescimento, a você dedico todo meu respeito e carinho.

À minha dupla de clínica, Thayná Luna, por ser uma grande companheira nessa jornada, por ter dividido comigo esse momento tão especial de aprendizado, pelas várias madrugadas de estudos, pelos conselhos, conversas, por todo carinho e apoio. Torço muito pelo seu sucesso, sei que és merecedora de cada conquista.

Ao incrível grupo de pesquisa, pela oportunidade de conviver com pessoas especiais, por todo aprendizado, ajuda, dedicação, disponibilidade e carinho. Tenho orgulho de fazer parte deste grupo.

Às amigas que fiz no decorrer da graduação, Thayná Luna, Bianca Mendes, Arella Muniz, Cinthya Sarmiento, Laiza Rocha, Lívia Rocha e Mariana Moura. Amigos são dádivas em nossas vidas, espero dividir inúmeras vitórias com cada uma de vocês.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%REL	Fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma
ACAM	Arruda Câmara
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CANPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO₂	Dióxido de Carbono
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CSLI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
GI₅₀	<i>Growth Inhibition 50</i>
IR	Índice de retenção
ISO	<i>International Standard Organization</i>
MCT	Ministério de Ciência e Tecnologia
MEC	Ministério da Educação
NaCl	Cloreto de sódio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
Ph	Potencial hidrogeniônico
PROCAD	Programa Nacional de Cooperação Acadêmica
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	<i>Total Growth Inhibition</i>
TR	Tempo de retenção
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma com sequência metodológica do estudo.....	12
Figura 2	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição ao quimioterápico Doxorrubicina (controle positivo).....	22
Figura 3	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição ao óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	22
Figura 4	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (98:2) do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	23
Figura 5	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (96:4) do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	23
Figura 6	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (94:6; 92:8) do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	24
Figura 7	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (90:10) do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	24
Figura 8	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (86:14) do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	25
Figura 9	Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (80:20) do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i>	25

Figura 10 Distribuição do percentual de viabilidade celular de linhagem de macrófagos RAW 264.7 de acordo com a concentração do óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius*..... **27**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação da atividade antimicrobiana com base nos parâmetros estabelecidos por Holetz et al (2002).....	16
Quadro 2	Linhagens de células tumorais e não tumorais humanas utilizadas nos testes de avaliação da atividade antiproliferativa.....	17
Quadro 3	Parâmetros estabelecidos pelo NCI para a classificação do potencial antiproliferativo.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Analitos identificados no óleo essencial dos frutos verdes de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi, por cromatografia gasosa com espectrometria de massa.....	20
Tabela 2	Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial dos frutos verdes de <i>S. terebintifolius</i> , de acordo com a espécie de <i>Candida</i>	21
Tabela 3	Valores de GI ₅₀ (<i>Growth Inhibition 50</i> – concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular) do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i> e de suas frações sobre cultura de células tumorais humanas.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 METODOLOGIA	12
2.1 Caracterização e sequência metodológica do estudo	12
2.2 Local do estudo	13
2.3 Material vegetal	13
2.3.1 Coleta do material vegetal	13
2.3.2 Obtenção do óleo essencial.....	13
2.4 Fracionamento do óleo essencial	13
2.4.1 Monitoramento inicial por meio de cromatografia em camada delgada (CCD)	13
2.4.2 Fracionamento em coluna filtrante em funil de placa porosa.....	14
2.5 Caracterização fitoquímica	14
2.5.1. Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM).....	14
2.6 Caracterização do potencial antifúngico	14
2.6.1 Microrganismos	15
2.6.2 Preparo do inóculo.....	15
2.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da Microdiluição em Caldo.....	15
2.6.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	16
2.7 Caracterização do potencial antiproliferativo em cultura de células tumorais humanas	16
2.8 Avaliação da citotoxicidade sobre a viabilidade celular de cultura de células de macrófagos raw 264.7	19
3 RESULTADOS	20
3.1 Caracterização fitoquímica	20
3.2 Atividade antimicrobiana	20
3.3 Atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas	21
3.4 Atividade citotóxica em linhagens de macrófagos raw 264.7	26
4 DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA *IN VITRO* DA *Schinus terebinthifolius* Raddi

Priscilla Guimarães Silva*

RESUMO

A incidência da candidose, o limitado arsenal de antifúngicos, associado ao expressivo índice de toxicidade e de resistência microbiana, desperta a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento desta infecção. Para tal, destacam-se as plantas medicinais, dentre as quais foi selecionada a *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida popularmente como aroeira-da-praia. Este estudo analisou a composição química do óleo essencial dos frutos verdes da *S. terebinthifolius* e avaliou, *in vitro*, suas atividades antimicrobiana e citotóxica sobre células tumorais e não tumorais humanas. A análise fitoquímica foi realizada por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM). A atividade antifúngica foi avaliada pela técnica da microdiluição em caldo, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM), seguida da Concentração Fungicida Mínima (CFM). A citotoxicidade foi em culturas de células tumorais e não tumorais humanas, incluindo viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7. O óleo essencial apresentou como compostos majoritários os terpenos: alfa-felandreno, beta-felandreno, alfa-pineno e germacreno D, e inibiu o crescimento da *Candida albicans* a partir da concentração de 1000µg/mL. Permitiu a viabilidade celular até a concentração de 62,5µg/mL e apresentou atividade citostática inespecífica para todas as linhagens tumorais, sem evidências de atividade citocida até a concentração de 250 µg/mL. O óleo essencial dos frutos verdes da *S. terebinthifolius* caracterizou-se pela presença marcante de terpenos, do seu potencial antifúngico frente a *C. albicans* e baixa citotoxicidade. Pode representar uma fonte promissora de princípios ativos para o desenvolvimento de medicamentos ou formulações para o tratamento da candidose.

Palavras-Chave: Plantas medicinais. Aroeira-da-praia. atividade antimicrobiana. Citotoxicidade

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

Email: priscillags@hotmail.com.br

1 INTRODUÇÃO

Dentre as infecções que acometem o corpo humano, destaca-se a candidose, micose mucocutânea de aspecto clínico variável, que acomete cerca de um milhão e meio de pessoas a nível mundial (KIM, 2016). A prevalência da candidose está associada a desequilíbrios homeostáticos do indivíduo e, dependendo das suas condições imunológicas, pode evoluir para a forma sistêmica da doença (TIRABOSCHI et al, 2007, SINGH et al, 2014). Como fator etiológico, destacam-se as leveduras do gênero *Candida*, em especial a *Candida albicans* (KLINGSPOR et al, 2015). Apesar da *C. albicans* ser a mais prevalente, outras espécies de *Candida* não-*albicans* emergem associadas a esta infecção. Adicionalmente, observa-se maior incidência da candidose, limitado arsenal de antifúngicos, associados à alta toxicidade sistêmica dos mesmos, e aumento da resistência, o que tornam uma preocupação no âmbito da saúde pública, despertando a necessidade clínica de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da candidose (BROWN et al, 2012, FERREIRA et al, 2015, BANDARA et al 2016, LUKASZUK et al, 2017).

Dentre a variedade de plantas utilizadas na medicina popular, destaca-se a *Schinus terebinthifolius* Raddi, espécime que possui comprovações de ação cicatrizante e antitumoral (GILBERT; FAVORETO, 2011), anti-inflamatória e antibacteriana (PIRES et al, 2004), antifúngica (El MASSRY et al, 2009, SILVA et al, 2010, ALVES et al, 2013) e antioxidante e citotóxicas contra células tumorais (BENDOUD et al, 2010). A *S. terebinthifolius* é uma árvore de pequeno a médio porte, pertencente à família Anacardiaceae (SANTOS et al, 2010, FREIRES et al. 2011), nativa da América do Sul e largamente encontrada na costa brasileira, com distribuição do nordeste ao sul do país (BARBOSA et al., 2007). É popularmente conhecida como aroeira-da-praia, pimenta-rosa, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e aroeira-mansa (MENDONÇA et al, 2014, AZEVEDO et al, 2015).

Apesar dos resultados positivos das propriedades biológicas da *S. terebinthifolius* e seu crescente uso para fins medicinais pela população, os resultados são ainda incipientes, de modo que muitos estudos ainda devem ser realizados, para validá-la como medicamento eficaz e seguro (AFFONSO et al, 2012; CARVALHO et al, 2013). Portanto, são necessários mais estudos antimicrobianos *in vitro* e *in vivo* e testes citotóxicos para subsidiar a avaliação dos reais benefícios e possíveis riscos de sua aplicação terapêutica (POSADZKI et al, 2013; VIEIRA et al, 2014). Diante desta premissa, o presente estudo avaliou a composição química do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi e avaliou *in vitro* suas atividades antifúngica e citotóxica sobre células tumorais e não tumorais humanas.

2 METODOLOGIA

2.1 Caracterização e sequência metodológica do estudo

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, cuja sequência metodológica está representada no fluxograma abaixo:

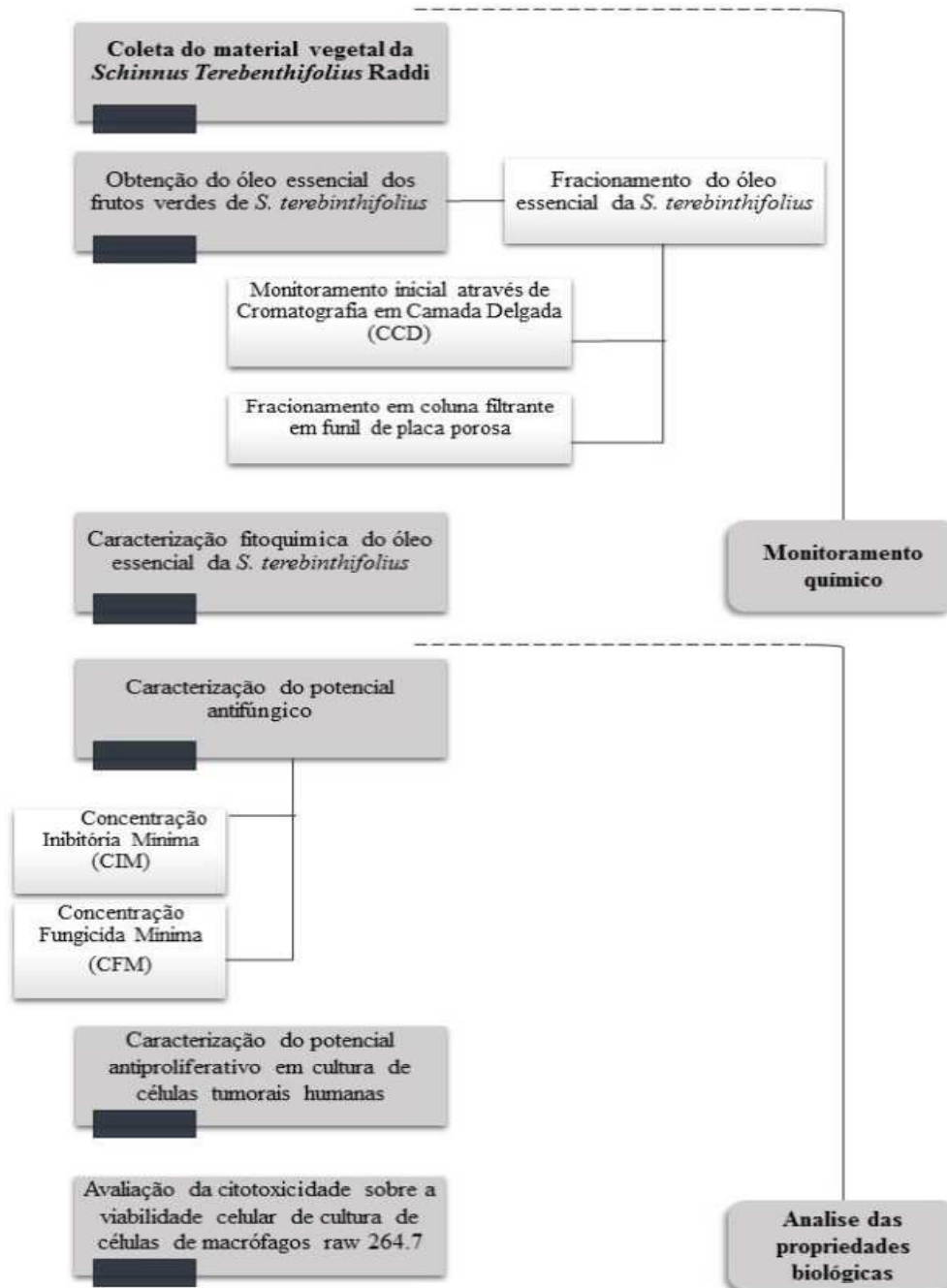


Figura 1: Fluxograma com sequência metodológica do estudo

2.2 Local do estudo

O estudo foi realizado na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), no Laboratório de Análises e Diagnóstico, Departamento de Odontologia, em Campina Grande, Paraíba, e no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - UNICAMP) em Campinas, São Paulo. Este trabalho integra o projeto realizado em parceria com a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), por meio do Convênio Federal Casadinho/Procad N° 552561/201108 do CNPq/MCT e Capes/MEC.

2.3 Material vegetal

2.3.1 Coleta do material vegetal

Os frutos verdes da *S. terebinthifolius* foram coletados na região do semiárido paraibano no município de Campina Grande, Paraíba, na área do Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (7°12' 35" S, 35° 54' 57"W). Os frutos foram armazenados em geladeira, até o momento da obtenção do seu óleo essencial. O espécime testemunho da *Schinus terebinthifolius* Raddi, 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 n° 486/ACAM.

2.3.2 Obtenção do óleo essencial

Para a obtenção do óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* foi realizada hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger. Utilizou-se 50g da planta e 200 mL de água destilada, procedendo-se à destilação por duas horas. O óleo essencial foi acondicionado em frasco de vidro hermeticamente fechado, envolto em papel alumínio e armazenados a -22°C até o momento do uso.

2.4 Fracionamento do óleo essencial

2.4.1 Monitoramento inicial por meio de cromatografia em camada delgada (CCD)

Os compostos químicos do óleo essencial de *S. terebinthifolius* foram monitorados inicialmente por CCD, utilizando-se cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ – Merck). Como fase móvel, foi utilizada a mistura de acetato de etila

(Synth®) e hexanoácido (Synth®) nas proporções de 85:15, respectivamente. A marcação dos componentes químicos da amostra foi visualizada a olho nu e sob luz ultravioleta (Solab® - 264 e 365 nm), e a cromatofolha revelada com anisaldeído, com posterior aquecimento a 100°C durante um minuto.

2.4.2 Fracionamento em coluna filtrante em funil de placa porosa

Realizou-se o fracionamento do óleo essencial de *S. terebinthifolius* em coluna cromatográfica filtrante em funil de placa porosa com fase sólida de sílica (Merck®), de partição sólido-líquido, de acordo com o gradiente de polaridade: hexano (1 x 100 mL); hexano:acetato de etila, nas proporções de 98:2; 96:4; 94:6, 92:8; 90:10; 88:12; 86:14; 84:16; 82:18 e 80:20, com 50 mL de cada solução. As frações resultantes foram monitoradas por CCD e reunidas conforme o perfil de similaridade e colorações diante do revelador empregado e em seguida concentradas a vácuo (BUCHI Rotavapor® R-215), resultando em seis frações finais, que foram utilizadas nos testes de atividade antiproliferativa sobre linhagens de células tumorais humanas.

2.5 Caracterização fitoquímica

2.5.1. Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM)

Análise fitoquímica do óleo essencial da *S. terebinthifolius* foi realizada por CG-EM. Aliquotas de 400 µL (micropipeta Eppendorf, Research plus, 100-1000 µL) do óleo foram colocados dentro de "vials" de vidro e adicionados 1,0 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) 30m x 0,25µm x 02,5µm e um detector operando no modo "scanning" (m/z 40-400). A programação de temperatura foi de 60° C (0,3 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 por meio 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).

2.6 Caracterização do potencial antifúngico

Foi analisado o potencial antifúngico do óleo essencial de *S. terebinthifolius* por meio de ensaios *in vitro*, utilizando a técnica da microdiluição em caldo, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

2.6.1 Microrganismos

Foram utilizadas as seguintes espécies de *Candida*: *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida glabrata* CBS 07; *Candida krusei* CBS 573 e *Candida dubliniensis* CBS 7889.

2.6.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008). Culturas de leveduras de 24 horas foram adicionadas em 5,0 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 530 nm, para obtenção de uma densidade equivalente a 5×10^6 UFC/mL. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura RPMI-1640, obtendo-se, ao final da mesma, uma densidade de 5×10^3 UFC/mL. Nos poços da microplaca, a solução final resultou em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

2.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da Microdiluição em Caldo

A determinação da CIM do óleo essencial foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, utilizando microplacas para contendo 96 poços. Inicialmente, foram depositados 100 μ L/poço do meio de cultura RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA). Em seguida, acrescentou-se no poço inicial 100 μ L do óleo essencial de *S. terebinthifolius* diluído em meio de cultura RPMI-1640 e 10% de dimetilsulfóxido de sódio - DMSO, numa concentração de 8 mg/mL. Procedeu-se a microdiluição, com a transferência de 100 μ L do conteúdo do primeiro poço para o seguinte. Este procedimento foi repetido até o último poço com obtenção das concentrações entre 2000 e 0,4882 μ g/mL do óleo essencial. Os 100 μ L finais foram desprezados. Posteriormente, 100 μ L da suspensão do microrganismo de 24 horas foram adicionados (5×10^3 UFC/mL). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. (CLSI 2008).

A Nistatina (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como controle positivo. Foram analisados a esterilidade do meio de cultura e o controle de crescimento do microrganismo. Os

ensaios foram realizados em duplicata, em dois experimentos diferentes.

A concentração inibitória mínima foi determinada por meio da alteração de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, indicativo de mudança do potencial hidrogeniônico (pH), ocasionada pelo crescimento microbiano (CLSI, 2008). A CIM correspondeu a menor concentração do óleo em que não foi observada essa alteração de cor.

Para classificação da atividade antimicrobiana do óleo, foram utilizados os parâmetros estabelecidos por Holetz et al (2002), dispostos no quadro 1.

Quadro 1: Classificação da atividade antimicrobiana com base nos parâmetros estabelecidos por Holetz et al (2002).

Holetz et al (2002)	
CIM < 100 µg/mL	Forte atividade
100 µg/mL < CIM < 500 µg/mL	Atividade moderada
500 µg/mL < CIM < 1000 µg/mL	Fraca atividade
CIM > 1000 µg/mL	Ausência de atividade

2.6.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a atividade fungicida, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações igual e maiores que a CIM, foram subcultivadas em meio ágar sabouraud dextrose (Merck®) e incubadas a 37°C por 48 horas. As CFMs foram definidas como a menor concentração que inibiu o crescimento visível do microrganismo (CLSI, 2008).

Para determinar o perfil da atividade antifúngica do óleo foi utilizado o cálculo da razão CFM/CIM, em que foi considerado como fungicida quando a razão CFM/CIM foi igual ou menor que 4 e fungistático quando maior que quatro (SIDDIQUI et al., 2013).

2.7 Caracterização do potencial antiproliferativo em cultura de células tumorais humanas

As linhagens utilizadas no estudo foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI), Frederick, Maryland, EUA. As linhagens celulares utilizadas na avaliação da atividade antiproliferativa (Quadro 2), foram cultivadas em frascos com 5,0 mL de meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco® -BRL, Grand Island, NY, USA) a

37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Forma Scientific®, CO₂ Water Jacketed Incubator), durante 24 horas.

Quadro 2. Linhagens de células tumorais e não tumorais humanas utilizadas nos testes de avaliação da atividade antiproliferativa.

TIPO CELULAR	LINHAGEM	ORIGEM
Glioma	U251	Tumoral
Mama	MCF-7	Tumoral
Ovário resistente	NCI-ADR/RES	Tumoral
Rim	786-0	Tumoral
Pulmão	NCI-H460	Tumoral
Próstata	PC-3	Tumoral
Leucemia	K562	Tumoral
Cólon	HT-29	Tumoral
Queratinócito	HaCat	Não tumoral

Foram preparadas suspensões celulares, para cada linhagem, com meio RPMI-1640 acrescido de 5% de SFB e 1% de penicilina:estreptomicina, e ajustadas em suas respectivas densidades de inoculação. Em placas de 96 poços, foram inseridos 100 µL da suspensão celular, sendo as placas posteriormente incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Foi também preparada uma placa controle (placa T₀), com todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

As amostras (óleo essencial de *S. terebinthifolius* e frações) foram diluídas em DMSO (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada amostra, em triplicata, nos poços iniciais e procedeu-se à diluição seriada, resultando em concentrações das amostras de 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL, (Placa T). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Como controle positivo, foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL, (100 µL por poço) em triplicata.

No momento da adição das amostras, as células inoculadas na placa T₀ foram fixadas com a adição de 50 µL por poço de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma®) a 50%, para a determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram

aplicadas. O TCA atua como fixador, precipitando proteínas. Células viáveis mantêm-se fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas.

Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram fixadas com TCA a 50% e incubadas por uma hora. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, e foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 µL por poço do corante proteico Sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%. A SRB é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada à proteína, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (SKEHAN et al., 1990). Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas por quatro vezes consecutivas com solução de ácido acético a 1%, para remover o corante não ligado às células, e, após a secagem, completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/poço de solução de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax) a 540 nm.

A porcentagem de inibição do crescimento de cada amostra testada foi calculada pelas seguintes equações: $100 \times [(T-T_0) / (C-T_0)]$, quando $T_0 < T \leq C$, e $100 \times [(T-T_0) / (T_0)]$, quando $T \leq T_0$, em que T equivale à média das absorbâncias das células tratadas, C ao controle de células e T_0 ao controle das células no dia da adição das amostras. Para classificação do potencial antiproliferativo da *S. terebenthifolius*, foram utilizados os parâmetros estabelecidos pelo NCI, dispostos em Fouche et al, 2008 (Quadro 3).

Quadro 3: Parâmetros estabelecidos pelo NCI para a classificação do potencial antiproliferativo.

NCI (FOUCHE et al., 2008)	
$\log GI_{50} > 1,5$	Ausência de atividade
$1,1 < \log GI_{50} < 1,5$	Fraca atividade
$0 < \log GI_{50} < 1$	Moderada atividade
$\log GI_{50} < 0$	Potente atividade

Utilizando a curva de concentração-resposta para cada linhagem celular, a GI_{50} (concentração necessária da amostra para que ocorra 50% de inibição de crescimento) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear, através do *software Origin 8.0* (OriginLab Corporation) (MONKS et al., 1991; SHOEMAKER, 2006).

2.8 Avaliação da citotoxicidade sobre a viabilidade celular de cultura de células de macrófagos raw 264.7

Foi preparada uma suspensão de células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 (ATTC, Manassa, VA, USA) em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), ajustada em sua respectiva densidade de inoculação (1×10^5 células/mL). Foram aplicados 100 μ l da suspensão em cada poço das placas de 96 poços, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. Foi preparada também uma placa controle (placa T_0).

A amostra do óleo essencial de *S. terebinthifolius* foi diluída em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) (Merck®), resultando na concentração de 0,1 g/mL. Em seguida, 100 μ L da amostra foram adicionados, em quadruplicata, nos poços iniciais. Procedeu-se a diluição seriada, resultando nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49 e 0,24 μ g/mL (Placa T). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 .

No momento da adição das amostras, as células inoculadas na placa T_0 foram fixadas com a adição de 50 μ L/ poço de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma®) a 50%, para a determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas.

Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram fixadas com TCA a 50% e incubadas por uma hora. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, e foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 μ L por poço do corante protéico Sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas por quatro vezes consecutivas com solução de ácido acético a 1%, para remover o corante não ligado às células, e, após a secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às

proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL por poço de solução de Trizma Base (10µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax) a 540 nm.

A viabilidade celular foi calculada através da seguinte equação: Viabilidade celular (%) = $(A_{amostra}/A_{controle}) \times 100\%$, em que $A_{amostra}$ e $A_{controle}$ equivalem às absorbâncias das amostras com e sem a adição do tratamento, respectivamente.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização fitoquímica

A análise por CG-EM do óleo essencial da *S. terebinthifolius* revelou que seus compostos majoritários são representados pelo alfa-felandreno com um valor de 37,05%, este elemento foi identificado aos 7,57 minutos, e o beta-felandreno, identificado aos 8,35 minutos, com área integrada de 24,10%. (Tabela 1)

Tabela 1: Analitos identificados no óleo essencial dos frutos verdes de *Schinus terebinthifolius* Raddi, por cromatografia gasosa com espectrometria de massa.

TR (MIN)	IR ^(A)	IDENTIFICAÇÃO	% REL. ^(B)
5,61	933	alfa-pineno	15,91
7,10	991	beta-mirceno	1,07
7,57	1007	alfa-felandreno	37,05
8,18	1025	para-cimeno	5,35
8,35	1029	beta-felandreno	24,10
17,02	1252	n.i. ^(C)	2,05
26,43	1481	germacreno D	14,47

Notas: **a)** índice de retenção;

b) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma;

c) não identificado.

3.2 Atividade antimicrobiana

O óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* apresentou, segundo a classificação de Holetz et al. (2002), fraca atividade frente à cepa de *Candida albicans* (CIM 1000 µg/mL). Não houve evidências de inibição do crescimento no tocante as cepas não-

albicans, *C. glabrata*, *C. Krusei* e *C. dubliniensis* (CIM > 1000 µg/mL). A partir da razão CFM/CIM, verifica-se perfil fungicida frente a cepa de *C. albicans* (CFM/CIM < 4). (Tabela 2)

Tabela 2. Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebintifolius*, de acordo com a espécie de *Candida*.

MICROORGANISMOS	OEA		CFM/CIM	NISTATINA CIM
	CIM µg/mL	CFM µg/mL		
<i>C. albicans</i>	1000	1000	1	0,9765
<i>C. glabrata</i>	2000	>2000	-	3,9062
<i>C. krusei</i>	>2000	>2000	-	0,9765
<i>C. dubliniensis</i>	2000	>2000	-	1,9531

Fungicida (CFM/CIM < 4) ou fungistático (CFM/CIM ≥ 4) (SIDDIQUI et al., 2013).

* (-) Não foi possível determinar a razão CFM/CIM.

3.3 Atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas

A doxorrubicina apresentou efeito citocida para todas as linhagens celulares testadas (Figura 2). O óleo essencial da *S. terebinthifolius* possuiu atividade citostática inespecífica, inibiu a proliferação das células de todas as linhagens tumorais, sem evidências de potencial citocida até a concentração de 250 µg/mL (Figura 3). A fração 98:2 produziu efeito citostático sobre as células das linhagens PC-3, exibindo perfil citocida nas linhagens K-562 e 786-0 na concentração 0,25 µg/mL, o perfil citocida para as demais concentrações foi observado a partir de 250 µg/mL (Figura 4). Nas frações 96:4 (Figura 5) e 94:6/98:2 (Figura 6) as amostras produziram atividade antiproliferativa inespecífica na concentração de 250 µg/mL. As frações 90:10 (Figura 7), 86:14 (Figura 8) e 80:20 (Figura 9) obtiveram atividade antiproliferativa inespecífica sobre suas linhagens, este resultado foi atingido em concentrações menores que a do óleo essencial (250 µg/mL), pode-se então supor que o fracionamento do óleo intensificou o efeito antiproliferativo.

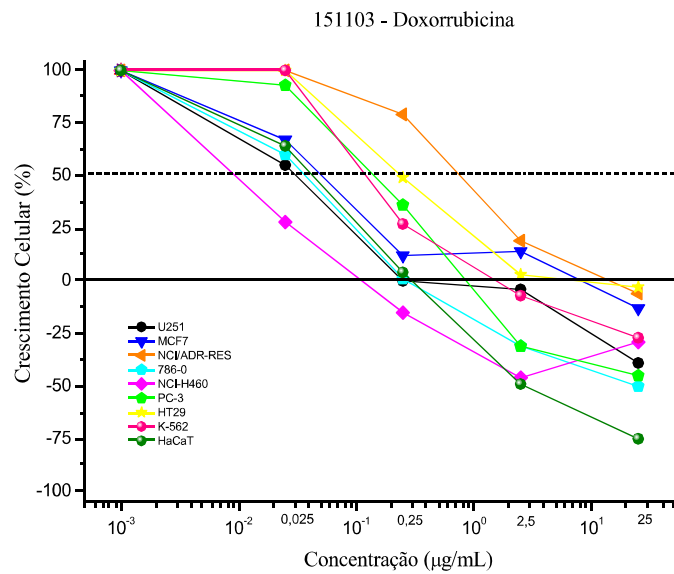


Figura 2. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição ao quimioterápico Doxorubicina

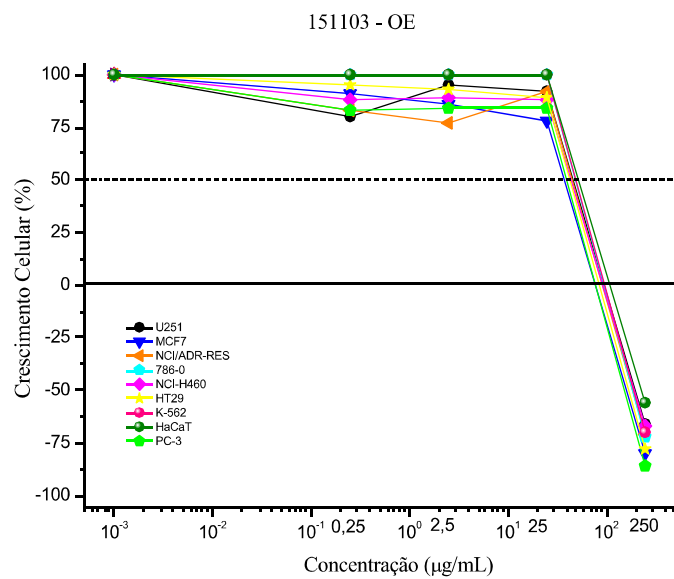


Figura 3. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição ao óleo essencial de *S. terebinthifolius*.

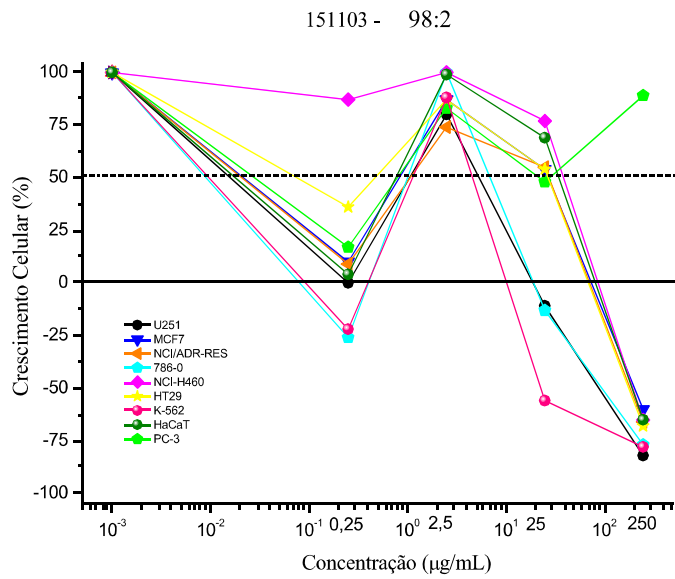


Figura 4. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (98:2) do óleo essencial de *S. terebinthifolius*

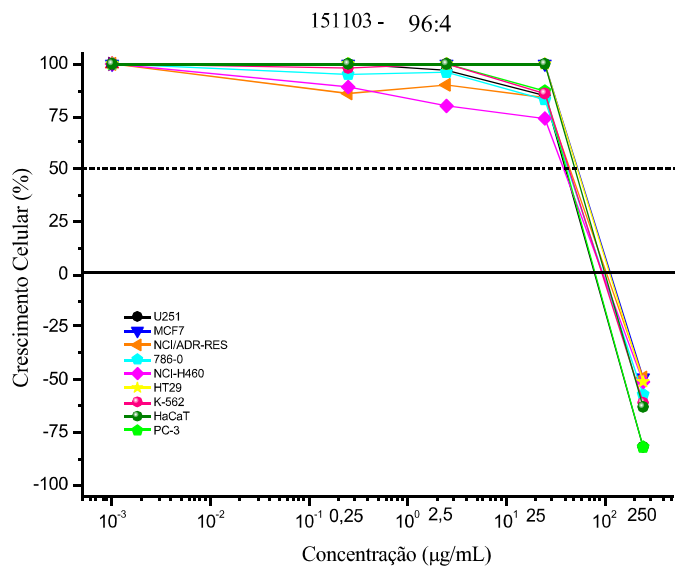


Figura 5. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (96:4) do óleo essencial de *S. terebinthifolius*

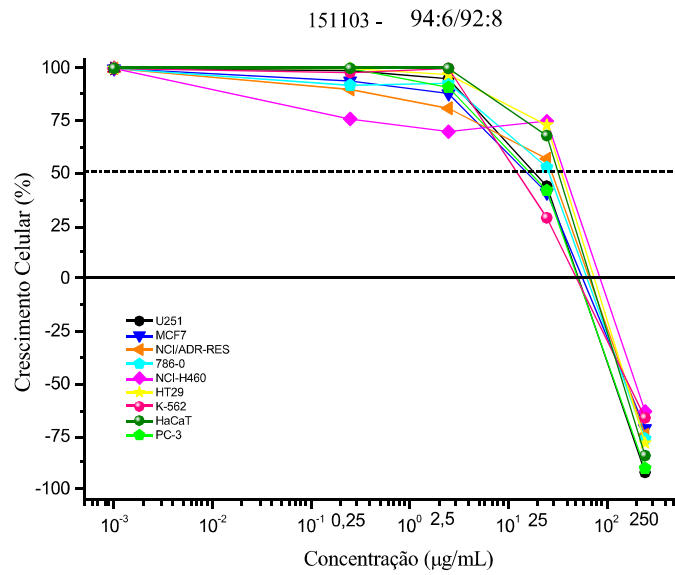


Figura 6. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (94:6; 92:8) do óleo essencial de *S. terebinthifolius*

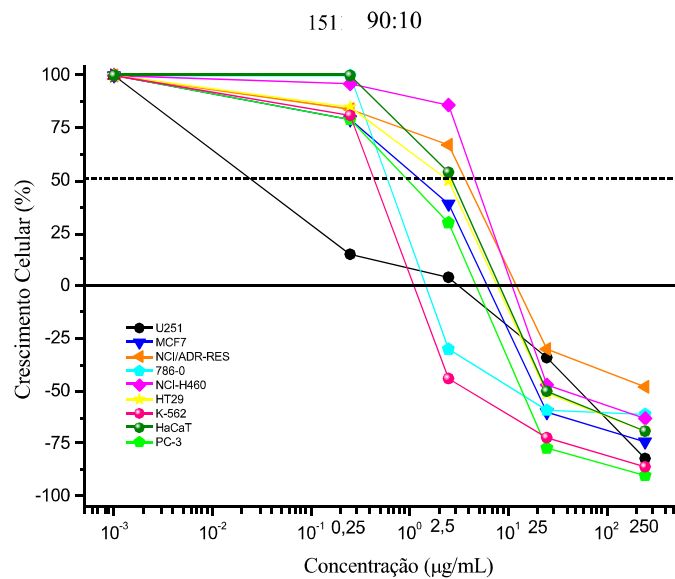


Figura 7. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (90:10) do óleo essencial de *S. terebinthifolius*

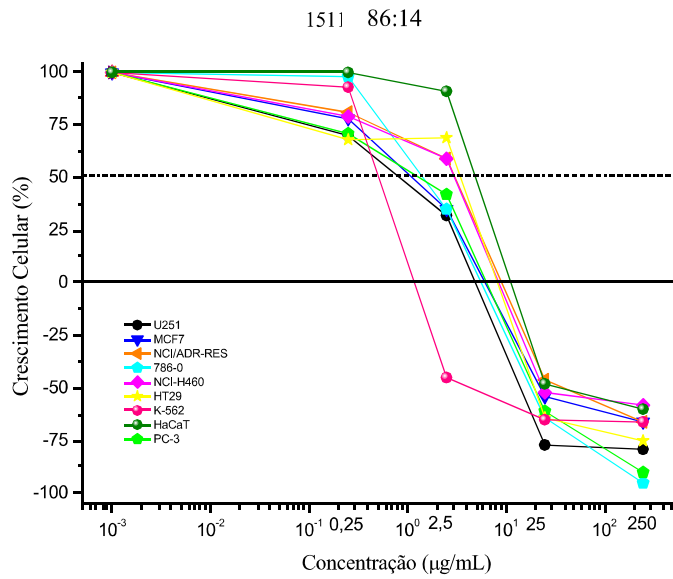


Figura 8. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (86:14) do óleo essencial de *S. terebinthifolius*

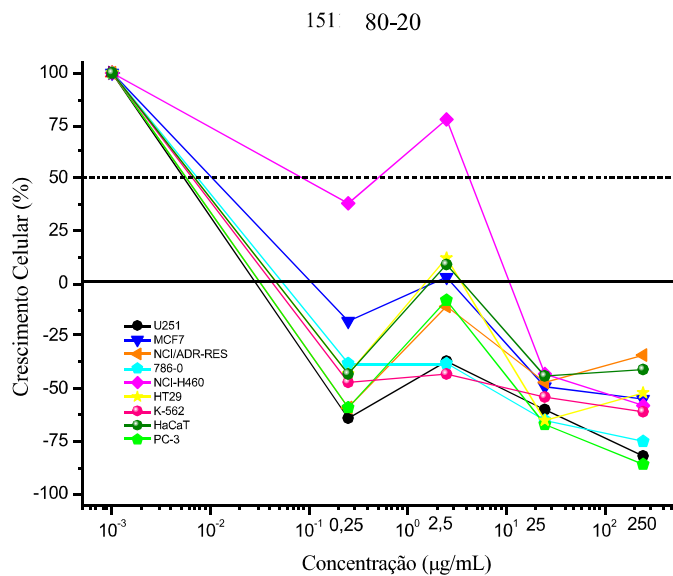


Figura 9. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração após 48 horas de exposição à fração hexano:acetato de etila (80:20) do óleo essencial de *S. terebinthifolius*

O óleo essencial e suas frações foram expressas em GI₅₀ (concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular). (Tabela 3)

Tabela 3. Valores de GI₅₀ (*Growth Inhibition 50* – concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular) do óleo essencial de *S. terebinthifolius* e de suas frações sobre cultura de células tumorais humanas.

Linhasgens	Doxorrubicina	OE <i>S. terebinthifolius</i>	98:2	96:4	94:6/92:8	90:10	86:14	80:20
U251	0,98	115,95	9,28	82,85	42,68	1,42	4,19	<0,25
MCF-7	5,71	76,60	61,79	226,01	52,93	6,00	6,39	<0,25
NCI-ADR/RES	13,03	108,77	47,58	122,83	63,00	17,97	10,15	<0,25
786-0	0,51	211,33	7,96	110,68	58,81	2,00	5,38	<0,25
NCI-H460	0,13	105,94	92,52	103,76	90,06	12,88	9,69	11,64
PC-3	1,32	76,37	>250	85,77	43,25	4,19	5,70	<0,25
HT-29	9,22	94,08	65,06	224,80	73,81	8,34	8,33	<0,25
K562	2,85	212,90	2,86	110,65	48,15	1,28	1,41	<0,25
HaCaT	0,34	221,81	82,99	217,55	63,43	9,15	13,33	<0,25
MEAN TGI	4,21	125,24	>67,13	133,4	59,08	6,76	6,40	<1,67

Linhasgens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); HT-29 (cólon); K562 (leucemia).

Linhasgem não tumoral humana: HaCaT (queratinócito).

TGI: *Total Growth Inhibition* – concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular.

3.4 Atividade citotóxica em linhagens de macrófagos raw 264.7

O óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* manteve a viabilidade celular acima de 85% até a concentração de 62,5µg/mL. O efeito citotóxico nos macrófagos foi perceptível na concentração de 125µg/mL, apresentando viabilidade celular, para esta concentração de 20,6% (Figura 10). De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993-5: 2009, as concentrações que mantêm a viabilidade celular abaixo de 70% são consideradas citotóxicas.

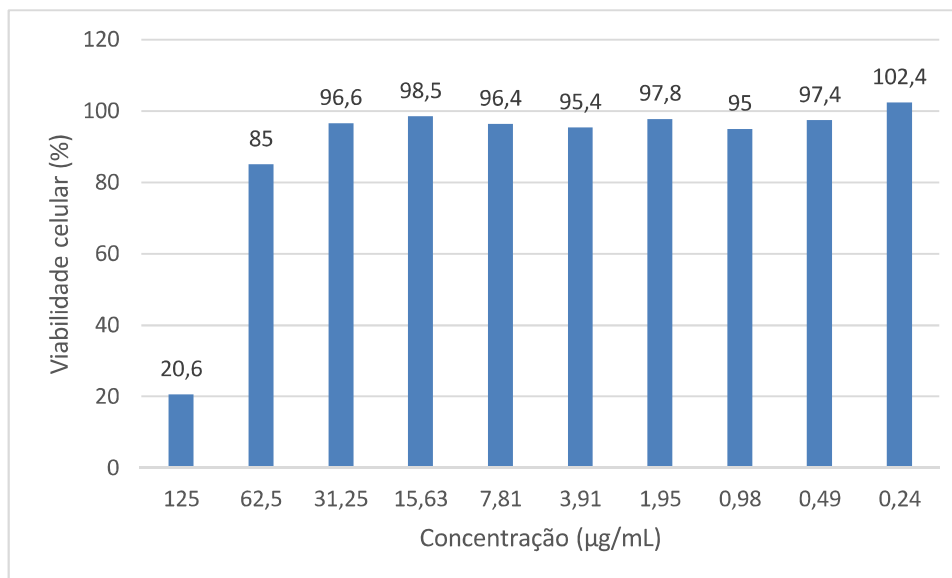


Figura 10. Distribuição do percentual de viabilidade celular de linhagem de macrófagos RAW 264.7 de acordo com a concentração do óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius*.

4 DISCUSSÃO

Metabólitos secundários conferem às plantas aplicação de cunho farmacológico com diversos efeitos biológicos no organismo (PEREIRA et al, 2011; MARTORELLI et al, 2011; SANTOS, et al., 2010; LIU et al, 2016). Dentre os compostos observados no presente estudo constam como majoritários os terpenos: alfa-feladreno, beta-feladreno, alfa-pineno e germacreno D, os quais também foram encontrados, mesmo que em diferentes proporções, em outros relatos de análise fitoquímica dos frutos de *S. terebinthifolius* (BARBOSA et al, 2007, SANTOS et al, 2007, BENDAOU et al, 2010, ROVEDA et al, 2010, OLIVEIRA et al, 2013, MACHADO; VALENTINI, 2014, COLE et al, 2014).

Em contrapartida, o perfil fitoquímico do óleo essencial obtido neste trabalho diferenciou, em parte, do apresentado por outros autores, que também avaliaram a composição do óleo dos frutos desta planta, como Roveda et al (2010), que obtiveram dentre outros compostos o sabineno, Z-salvene e limoneno. Oliveira (2013), por sua vez, identificou dezesseis compostos, dentre eles alguns disparem com os elencados anteriormente, como: ρ -menth-1-en-9-ol, o canfeno, e o hedicariol. Barbosa et al (2007) e Santos et al (2007) encontraram elemol, α -cadiol, sabineno, δ -3-careno, sylvestreno, dentre outros.

A presença de tais compostos pode ser influenciada pelas condições que a planta está

sujeita (SILVA, 2003, ATTI DOS SANTOS et al, 2007, MOURA et al, 2007), como a preponderância de fatores genéticos, geográficos, locais e ambientais, como a própria maturação do fruto (IBRAIM et al, 2001, SILVA, 2003, BARBOSA et al, 2007, MELO et al, 2014, ROVEDA et al, 2010, ZHANG et al, 2016).

O alfa-felandreno (37,05%) e o beta-felandreno (24,10%) foram preponderantes dentre os outros compostos identificados. Estes caracterizam-se como hidrocarbonetos monoterpenicos. Os terpenos se destacam por formar uma diversa classe de metabólitos secundários, que geralmente estão presentes como compostos majoritários em óleos essenciais derivados das folhas ou partes aéreas de diferentes plantas (VELASCO- NEGUERUELA et al, 2003, HORNBACK, 2006, SANTOS et al, 2007, DEWICK, 2009). Alguns estudos demonstram significativa atividade bactericida e fungicida desses compostos (KOUKOS et al, 2001, VELASCO et al, 2003, BAKKALI, 2008). O alfa-felandreno também se destaca por apresentar comprovada atividade anti-inflamatória (BARBOSA et al, 2007).

O alfa-pineno é um monoterpeno e apresenta atividade antimicrobiana com efeito bacteriostático (LEITE, 2007) e antifúngico (PADUCH et al 2007, LANG et al, 2012). Além disso, afeta o metabolismo energético de mitocôndrias através de pelo menos dois mecanismos, sendo eles o desacoplamento da fosforilação oxidativa ou inibição da cadeia transportadora de elétrons (ABRAHIM et al, 2003; CHANG et al, 2007).

Diversos estudos comprovam a ação antimicrobiana do germaceno-D, além de reconhecê-lo como constituinte majoritário de óleos essenciais extraídos de diferentes espécies (GONZAGA et al, 2003, IACOBELLIS et al, 2005, ALMEIDA; DELACHIAVE; MARQUES, 2005). Entretanto, estudos alegam que o mesmo se mostrou inativo contra diversas espécies, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans*, *C. krusei*, dentre outros. Por outro lado, deve-se considerar que a lipofilia de hidrocarbonetos de estrutura terpênica, presente na composição de óleos essenciais com vertentes antimicrobianas, quando associada aos lipídeos da membrana celular, aumentam a permeabilidade desta e facilita a penetração de agentes antimicrobianos no interior celular (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003).

A atividade antifúngica do para-cimeno, foi comprovada por Lang et al (2012). Monoterpeno aromático biosintético de fórmula molecular C₁₀H₁₄, precursor do carvacrol e

largamente presente entre os óleos essenciais. O mesmo demonstra propriedades lipolítica, herbicida e antimicrobiana. Além disso, estudos têm mostrado que o p-cimeno e os seus derivados monoterpenos são eficazes antioxidantes e anticarcinogênicos (KODALI et al, 2008, BURT, 2004, MEDEIROS et al, 2011).

Considerando os resultados da atividade antimicrobiana e os critérios estabelecidos por Holletz et al (2002) a atividade antifúngica do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi foi classificada como fraca (CIM = 1000µg/mL), no entanto, ao se considerar os parâmetros utilizados por Aligiannis (2001), que classificam: 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, temos que o óleo essencial obtido nesse estudo tem ação classificada como moderada. Definiu-se, também, o perfil fungicida para a *Candida albicans* (CFM/CIM < 4) (SIDDIQUI et al, 2013).

Essa atividade, possivelmente, foi decorrente da ação associada dos diferentes compostos presentes na composição do óleo essencial da *S. terebinthifolius*, representados pelos metabólicos secundários, os terpenos (SILVA et al, 2012). É válido destacar a ação antifúngica do óleo essencial frente a *C. albicans*, visto que constitui a espécie de *Candida* mais comumente associada à candidose (WÜTHRICH; DEEPE; KLEIN, 2012, CLEVELAND et al. 2015, KLINGSPOR et al. 2015), que pelos motivos já citados representa um problema de saúde pública.

Extratos ou óleos essenciais derivados de plantas são tidos como fontes importantes de compostos antitumorais. Segundo os relatos de Cragg; Newman (2000), mais de 50% dos fármacos desenvolvidos em ensaios clínicos para a atividade anticâncer foram isolados a partir de fontes naturais ou estão relacionados a estas, fato que impulsiona a pesquisa de compostos fitoterápicos que apresentem atividade sob os variados tipos de linhagens tumorais (MESQUITA et al, 2009). Ademais, foi demonstrado que os constituintes do óleo essencial são eficazes na redução da proliferação de células tumorais ao exercer efeitos apoptóticos (BAKKALI et al, 2008). O efeito antiproliferativo da *S. terebinthifolius* foi comprovado em alguns estudos (BENDOUD et al, 2010, MATSUO et al, 2011, FEDEL-MIYASATO et al, 2014).

Neste estudo, conforme os critérios utilizados por Sufness; Pezzuto (1990), as frações 90:10, 86:14, 80:20 apresentaram atividade promissora, visto que os valores obtidos para GI₅₀

das linhagens testadas foram menores que 30. Entretanto, com base nos critérios utilizados pelo NCI (FOUCHE et al., 2008), não houve atividade anticâncer para as frações e para o óleo testado.

Alguns compostos identificados no óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* apresentam propriedades anticancerígenas. Shu-Ling Hsieh et al (2014) estudaram a relação do alfa-felandreno com células tumorais hepáticas humanas. Os autores concluíram que o alfa-felandreno é responsável por induzir a necrose das células tumorais por meio da depleção de ATP, fato que conduz as células para um estado necrótico (NISHIKAWA et al, 2003, WARING, 2005). A necrose, uma das principais vias de morte celular, inclui, principalmente, danos aos lipídeos da membrana, respostas proinflamatória, perda da homeostase da bomba iônica da membrana e esgotamento da energia celular (BAIGE et al, 2008).

O alfa-pineno, que foi o terceiro composto mais prevalente na composição da planta em questão, foi estudado por Matsuo et al (2011), que verificaram seu efeito sob células derivadas de melanoma. Constataram que este composto possui potencial para induzir a apoptose em células de neoplasias malignas. O estudo ainda traz dados sobre tratamento sistêmico de ratos com alfa-pineno, apresentando uma redução acentuada nos nódulos de tumores pulmonares indicando assim uma atividade importante contra o melanoma metastático.

A viabilidade celular em cultura de macrófagos RAW 264.7 foi aplicada para avaliação da citotoxicidade do óleo essencial da *S. terebinthifolius*, cujo método é disseminado em estudos *in vitro* (JOHNSON et al, 2013, OLIVEIRA et al., 2013, OLIVEIRA et al, 2014, BENSO et al, 2015, DZOYEM et al, 2015, JANG et al, 2015). Em consonância com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993-5: 2009, concentrações que mantêm a viabilidade celular abaixo de 70% são consideradas citotóxicas. O óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius*, até a concentração de 62,5µg/mL, manteve-se dentro dos padrões esperados, com a viabilidade celular acima de 85%. A baixa toxicidade sobre a cultura de células de macrófagos (Figura 10) e sobre os queratinócitos, que por sua vez foi observado na atividade antiproliferativa (Tabela 3), realçam a importância de estudos que asseguram o uso desta planta como medicamento eficaz

Johann et al (2010) verificaram as propriedades biológicas do extrato hidroalcoólico da

S. terebinthifolius, obtido a partir dos frutos da planta, frente ao *Paracoccidioides brasiliensis*, seus resultados elucidam que, apesar da comprovação da ação antifúngica, o extrato não demonstrou evidências de citotoxicidade frente a cultura de células de macrófagos RAW 264.7.

O óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresentou resultados positivos frente a suas propriedades biológicas. O seu potencial antifúngico da *C. albicans*, associado ao baixo potencial citotóxico apontam a relevância desta planta para o tratamento da candidose. No entanto, é preciso avançar nos estudos, com ensaios *in vitro* e *in vivo*, para comprovação de sua eficácia farmacológica, assegurando seu uso de forma eficaz e segura.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresenta atividade antifúngica frente à *Candida albicans* e baixa citotoxicidade *in vitro* sobre células tumorais e não-tumorais humanas. Esses resultados indicam a importância da realização de outros estudos com a *S. terebinthifolius* a fim de promovê-la como alternativa terapêutica para a candidose.

ABSTRACT

The incidence of candidiasis, the limited arsenal of antifungal drugs, associated with the expressive toxicity and microbial resistance index, has led to the need for new therapeutic alternatives for the treatment of this infection. For this, the medicinal plants stand out, among which was selected the *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularly known as the beach aroeira. This study analyzed the chemical composition of the essential oil of the green fruits of *S. terebinthifolius* and evaluated, *in vitro*, its antimicrobial and cytotoxic activities on human tumor and non-tumor cells. Phytochemical analysis was performed by Gas Chromatography with Mass Spectrometry (GC-MS). The antifungal activity was evaluated by the microdilution technique in broth, with minimum inhibitory concentration (MIC), followed by Minimal Fungicide Concentration (CFM). Cytotoxicity was in human tumor and non-tumor cell cultures, including cell viability in RAW 264.7 macrophages. The essential oils were terpenes: alpha-felandrene, beta-felandren, alpha-pinene and germacrene D, and inhibited the growth of *Candida albicans* from the concentration of 1000 µg / mL. It allowed cellular viability up to the concentration of 62.5 µg / mL and showed non-specific cytostatic activity for all tumor lines, with no evidence of cytotoxic activity up to 250 µg / mL. The essential oil of the green fruits of *S. terebinthifolius* was characterized by the marked presence of terpenes, its antifungal potential against *C. albicans* and low cytotoxicity. It may represent a promising source of active ingredients for the development of medicaments or formulations for the treatment of candidosis.

Keywords: Medicinal Plants. Anacardiaceae. Products with antimicrobial action.

REFERÊNCIAS

- ABRAHIM, D., et al Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 985-991, 2003.
- 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.** v.23, n.1, p.180-185, 2012
- ALMEIDA, L.F.R.; DELACHIAVE, M.E.A.; MARQUES, M.O.M. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. - Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.1, p. 35-38. 2005.
- ALVES, L.A. et al. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Acta Odontologica Scandinavia**. p. 1-7, 2013
- ATTI DOS SANTOS, A.C. et al. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi, **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.1011-1013, 2007
- AZEVEDO, C. F.; QUIRINO, Z. G. M.; BRUNO, R. L. A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeiravermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 26-35, 2015
- BAKKALI, F. et al, Biological effects of essential oils – a review, **Food Chem. Toxicol.** V.46, p.446–475, 2008.
- BANDARA, H.M.H.N.; MATSUBARA V. H.; SAMARANAYAKE L. P. Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections, **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 2016
- BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus Terebinthifolius* Raddi. **Quimica Nova**, v.30, n. 8, p. 1959-1965, 2007
- 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.
- BENSO, B., et al, *Malva sylvestris* Inhibits Inflammatory Response in Oral Human Cells. An In Vitro Infection Model. **Plos One**, v. 10, n.10, p.15, 2015
- 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.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**. v. 4, p.165–113, 2012
- BURT, S.A.; Essential oils: The antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

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

CHANG, H.J.; KIM, H.J.; CHUN, H.S. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. **Life Sciences**, v. 80, p. 835-841, 2007.

CLEVELAND A. A. et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of Candida resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. **PLUS ONE**, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - CLSI M27-A3, Wayne, PA, USA, v.28, n.14, p.13, 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 stains of hospital origin. **Braz. J. Microbiol.**, v.45, n.3, p. 821-828, 2014

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions, **Expert Opin. Invest. Drugs** v. 9, p. 2783–2797, 2000.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach, **John Wiley and Sons**, 3^a Ed, p. 187-205. 2009.

DZOYEM, J. P. et al Cytotoxicity, nitric oxide and acetylcholinesterase inhibitory activity of three limonoids isolated from Trichilia welwitschii (Meliaceae). **Biol. Res.** V.48, p.6, 2015

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

FEDEL-MIYASATO, L.E. et al. Antigenotoxic and antimutagenic effects of Schinus terebinthifolius Raddi in Allium cepa and Swiss mice: a comparative study. **Genet Mol Res.** V. 13, n.2, p.3411-25, 2014

FERREIRA, G.L.S., et al. Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, p. 1-8. 2015

FOUCHE, G. et al. In vitro anticancer screening of South African plants. **J. Ethnopharmacol.** V.119, n.3, p. 455-461, 2008.

FREIRES, I.A. et al. Atividade antifúngica de Schinus Terebinthifolius (Aroeira) sobre cepas do gênero Candida. **Rev Odontol Bras Central**; v.20, n.52, p. 41-45, 2011

GILBERT, B., FAVORETO, R. Schinnus terebetinfolius (Aroeira) sobre cepas do gênero Candida. **Rev Odontol Bras Central**, v.52, n.20, 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.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V. 97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HORNBACK, J. P. Organic Chemistry, 2^a ed. Ed. Thomson Learning, Belmont, p. 1184-1196. 2006.

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.

IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science in Finland**, v. 10, p.243-259, 2001.

International Standard Organization (ISO - 10993-5). Biological evaluation of medical devices -Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3rd edition, p. 1-42, 2009.

JANG, M., JEONG, S., KIM, B, KIM, J. Extraction Optimization for Obtaining *Artemisia capillaris* Extract with High Anti-Inflammatory Activity in RAW 264.7 Macrophage Cells. **Biomed Res. Int.** p. 9, 2015.

JOHANN S, et al. : Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 2459–2464, 2008.

JOHNSON, T. A., et al. (+)-Altholactone exhibits broad spectrum immune modulating activity by inhibiting the activation of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cell lines. v. 21, n. 14, p. 4358–4364, 2013

KIM, J.Y. Human fungal pathogens: why should we learn? **J. Microbiol.** v.54, p.145–148, 2016.

KLINGSPOR L. et al. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). **Clin. Microbiol. Infect.** v.21, p.87, 2015

KODALI, S. et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8788-8795, 2008.

KOUKUS, P. K., et al. Chemicals from Greek forestry biomass constituents of the leaf oil of *Myrtus communis* L. grown in Greece. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 245-246, 2001.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour Frag. J.**, v. 27, p. 13-39, 2012

LEITE, A. M. et al . Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 43, n. 1, Mar. 2007

LIU, X. et al. Potential Antifungal Targets against a Candida Biofilm Based on an Enzyme in the Arachidonic Acid Cascade—A Review. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p. 1–9, 2016

ŁUKASZUK et al. Retrospective observation of drug susceptibility of Candida strains in the years 1999, 2004, and 2015. **PeerJ** v. 5, p. 3038; 2017

MACHADO, B. C. T.; VALENTINI, S. A. Avaliação do potencial farmacotécnico e antimicrobiano de diferentes extratos da Aroeira Pimenteira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Rev. Saúde e Biol.**, v.9, n.1, p.34-42, 2014.

MARTORELLI, S. B. F. Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidro alcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) a 30% em orabasa – estudo “in vivo”. **Int J Dent**, v.10, n.2, p.80-90, 2011

MATSUO, A. L., et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 449–454, 2011

MEDEIROS, M.G.F. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.60, p 237-241, 2011

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.** 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

MESQUITA, M.L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines, **J. Ethnopharmacol.** V.123, p.439–445, 2009.

MOURA, F.T. et al. Caracterização química do óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira vermelha), 2007.

MONKS, A., et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.** v.83, n.11, p. 757-766, 1991.

NISHIKAWA, K.; SATOH, H.; HIRAI, A.; SUZUKI, K.: α -Tocopheryloxybutyric acid enhances necrotic cell death in breast cancer cells treated with chemotherapy agent. **Cancer Lett** 201, 51–56, 2003.

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

OLIVEIRA, J.R., et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). **Arch. Oral Biol.** V.59, n.8, p.808-814, 2014

PADUCH, R. et al. Terpenes: Substances useful in human healthcare. **Arch Immunol Ther Exp** v.55, p. 315–327, 2007

PEREIRA, E. M. et al. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta Medica**, v. 77, p. 401-4, 2011.

PIRES, O.C. et al. Analise 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

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Contamination and adulteration of herbal medicinal products (HMPs): an overview of systematic reviews. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, p. 295-307, 2013.

ROVEDA, L. M. et al. Composição química e avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). In Anonymous **Anais do X Simpósio Brasil-Japão**, 2010

SANTOS A.C.A. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn.** V.20, n. 02, p.154-159, 2010;

SANTOS, M.R.A. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus*. **Revista Fitos**, v.3, n.1, p.77-84, 2007.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nat. Rev. Cancer** v.6, n.10, p.813-823, 2006.

SHU-LING, H. et al. Induction of Necrosis in Human Liver Tumor Cells by α -Phellandrene. **Nutrition And Cancer.** Vol. 66, Iss. 6, 2014

SIDDIQUI, Z. N. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Sudi Chemical Society**, v.17, p. 237-243, 2013

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

SILVA, M. J. D. et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.33, n.2, p.267-274, 2012.

SILVA, S. R. S. et al. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* chell. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Vol. 1. - p. 63-70, 2003.

SINGH, A. et al. Oral candidiasis: An overview. **J Oral Maxillofac Pathol**. v.18, Suppl 1, p.S81-5, 2014

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery, in: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. **Academic Press, London**, p. 71-133, 1990.

TIRABOSCHI, I.N., et al. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatologia. **Rev Iberoam Micol**. V. 24, n.4, p. 263-7, 2007.

VELASCO-NEGUERUELA, A. et al. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil from the areial parts of *Pimpinella junoniae* Ceb. & Ort., gathered in La Gomera, Canary islands, Spain. **Jchromatogr A**., v.1011, p .241-244, 2003

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

WARING P: Redox active calcium ion channels and cell death. **Arch. Biochem Biophys** 434, 33-42, 2005.

WÜTHRICH, M., DEEPE, G.S. JR. & KLEIN, B. Adaptive immunity to fungi. *Annu. Rev. Immunol*. V.30, p.115-148, 2012.

ZHANG, Y.B., et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control** v.59, p.282-289, 2016.