

**UNICESUMAR – CENTRO UNIVERSITÁRIO CESUMAR
PROGRAMA DE MESTRADO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi (ANACARDIACEAE)**

SILVANA GOZZI PEREIRA LIMA
DIÓGENES APARÍCIO GARCIA CORTEZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MARINGÁ
2015**

**UNICESUMAR – CENTRO UNIVERSITÁRIO CESUMAR
PROGRAMA DE MESTRADO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi (ANACARDIACEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro Universitário Cesumar (UNICESUMAR), como requisito à obtenção do título de Mestre em Promoção da Saúde.

**MARINGÁ
2015**

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
ARTIGO CIENTÍFICO.....	08
Avaliação da Atividade antileishmania e antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae).....	09
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
ANEXOS.....	31
Anexo A – Industrial Crops and Products.....	32

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por uma introdução e um artigo científico originado de pesquisas realizadas no Laboratório de Análises Químicas e Biológicas do Unicesumar e no Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais e Biotecnologia, localizado na Universidade Estadual de Maringá, ambos em Maringá-Pr.

Artigo - Autor (es): Silvana Gozzi Pereira Lima, Diógenes Aparício Garcia Cortez. Os autores realizaram um experimento, com a finalidade de analisar as atividades biodiversas do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi quanto a ação leishmanicida, citotóxica e antimicrobiana, para considerar seu prospectivo uso terapêutico.

Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, o artigo foi redigido de acordo com as normas da Revista Industrial Crops and Products (Anexo A).

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças decorre desde os povos antigos, e ainda nos dias atuais, esse recurso constitui a única forma de tratamento terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos (Bertoldi, 2006). Nesse sentido, as plantas medicinais correspondem às mais antigas “armas” empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos (Oliveira e Araujo, 2007).

As práticas populares ao longo dos anos levaram ao acúmulo de informações de suma importância, onde todo esse acervo de conhecimento continua sendo usado para novas pesquisas. Estas, demonstram que, cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica, vieram das recomendações da medicina popular (Yunes et al., 2001).

À frente de diferentes espécies nativas existentes, encontra-se a espécie vegetal *Schinus terebinthifolius* Raddi, pertencente à família botânica Anacardiaceae, a qual é representada por 70 gêneros e cerca de 600 espécies de árvores ou arbustos, conhecidas por serem frutíferas e apresentarem madeira de boa qualidade (Crónquist, 1981; Corrêa, 1984; Fleig, 1987).

No Brasil, esta planta medicinal recebe diversas variações de nomes populares, tais como: aroeira, aroeira-mansa, aroeira-vermelha, cambuí, coração-de-bugre, fruto-de-sabiá, dentre outras (Corrêa, 1984; Lorenzi e Matos, 2002). Embora seja também conhecida popularmente como “pimenta rosa”, a mesma não possui qualquer parentesco com a família das pimentas. Na verdade, possui parentesco com o caju, a manga, o cajá-mirim, dentre outras anacardiáceas frutíferas conhecidas (Lenzi e Orth, 2004).

De acordo com a literatura, várias substâncias presentes no extrato da aroeira apresentam ação antimicrobiana, decorrente da presença de substâncias fenólicas, as quais atuam contra uma série de microorganismos, tais como: *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (gram-positivos), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativos), e a levedura *Candida albicans* (Martinez et al., 1996; Guerra et al., 2000; Moure et al., 2001; Sokmen et al., 2004).

A aroeira possui potencialidades medicinais, fitoquímicas e alimentícias, demonstrando grande importância comercial, além de seus metabólitos secundários

auxiliarem no tratamento de diversos males (Guerra et al., 2000; Amorim e Santos, 2003; Fernandez et al., 2008).

Os compostos voláteis dos óleos essenciais são utilizados como antioxidantes, tanto para conservar e evitar o crescimento de microrganismos, bactérias e fungos em alimentos processados, como também na indústria de cosméticos e perfumes na forma de loções, géis, e sabonetes (Degaspari, 2005; El-Massry et al., 2009).

Em virtude destes fatos mencionados, a espécie *Schinus terebinthifolius* é uma planta que desponta como uma nova alternativa para a diversificação agrícola, pois contém óleos essenciais distribuídos em suas folhas, frutos e troncos em teores e composição variantes e não causam nenhuma toxicidade em animais e nem em seres humanos (Palazzo et al., 1993; Barbosa et al., 2007).

A leishmaniose se trata de uma doença infecciosa zoonótica, encontrada por todo o mundo, e atinge o homem e os animais (Rath et al., 2003). É causada por diferentes espécies do parasita do gênero *Leishmania* e é classificada de três maneiras: leishmaniose visceral ou calazar que é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia; leishmaniose mucocutânea que apresenta lesões na mucosa nasal e oral; leishmaniose cutânea sendo caracterizada por lesões ulcerativas em áreas expostas (Bezerra-Soares et al., 2004).

A *Leishmania* apresenta duas formas no seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. A forma promastigota são extracelulares e vivem no trato digestório do inseto vetor. A forma amastigota são intracelulares e parasitam macrófagos do hospedeiro vertebrado (Michaelick, 2003).

O tratamento de doenças causadas por esses protozoários é difícil, pois, por serem também eucariotos compartilham muitas características com as células de mamíferos. Dessa forma, a atuação dos agentes antiparasitários ocorre em vias ou alvos comuns ao parasita e ao hospedeiro (Murray et al., 2000). Os compostos antimoniais indicados para o tratamento das leishmanioses são o Pentostan® (estibogluconato de sódio) e o Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) (Croft e Combs, 2003). A Anfotericina B ou a Pentamidina são as drogas de segunda escolha utilizadas (Grevelink e Lerner, 1996; Sereno et al., 2000). Contudo, vale lembrar que além do alto custo, essas drogas são tóxicas e apresentam muitos efeitos colaterais.

Além das doenças causadas por parasitos, temos as infecções por bactérias que vem a cada dia se mostrando mais resistentes as drogas disponíveis (Celiktas et al., 2007). Diante das infecções, destaca-se algumas bactérias e suas doenças. A bactéria *Staphylococcus aureus* pertence ao grupo dos coccus gram-positivos, fazem parte da microbiota humana e podem causar doenças como: pneumonia, meningite, endocardite entre outras. Essas bactérias são capazes de resistir à dessecação e ao frio, podendo ser resistentes por longos períodos (Bannerman, 2003; Cavalcanti, 2005; Cassettari et al., 2005). Já os *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) são bactérias resistentes e causam graves problemas em ambientes hospitalares, levando a várias doenças como: furúnculos, pneumonia, osteomielite, endocardite, bacteremia, entre outras (León et al, 2011).

Os *Enterococcus faecalis* são bactérias gram-positiva que sobrevivem em ambiente com ou sem oxigênio, faz parte da microbiota normal do trato intestinal, podendo também ser encontrada na mucosa oral, e vaginal e na pele. Atualmente são os agentes responsáveis pelas infecções hospitalares, por terem adquirido resistência a maioria dos antimicrobianos (Teixeira et al.,2004).

Os *Bacillus cereus* são microrganismos gram positivos encontrados no solo, vegetação, água e pelos de animais. São causadores das doenças de origem alimentar e seus sintomas são diarreia e náuseas (Bennett e Bilay, 2001).

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbica gram-negativa, pertencente a microbiota intestinal, causadora de infecções intestinais e infecções extra-intestinais (Kaper et al., 2004). A *Pseudomonas aruginosa* são bacilos gram negativo aeróbicos, suportam grandes alterações de temperaturas, encontrados no ambiente, causadores de infecções hospitalares. E com o uso indiscriminado de antibióticos sua incidência está aumentando (Ferrareze et al., 2007).

Portanto, diante do grande número de infecções, surge a necessidade a cada dia de prevenção e promoção da saúde, através de pesquisas científicas que visem a descoberta de novos medicamentos que contribuam para o tratamento das mesmas.

ARTIGO 1

Título: Avaliação da atividade antileishmania e antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)

Revista: Industrial Crops and Products

SITE: www.journals.elsevier.com¹

¹ Normas da Revista Industrial Crops and products no Anexo A.

Avaliação da atividade antileishmania e antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)

Silvana Gozzi Pereira Lima¹

Diógenes Aparício Garcia Cortez²

¹Aluna do Programa de Pós Graduação em Promoção da Saúde, Centro Universitário de Maringá.

²Professor doutor, Docente no Programa de Pós Graduação em Promoção da Saúde, Centro Universitário de Maringá, Av. Guedner, 1.610, Jardim Aclimação, 87050-390 Maringá-PR, Brasil, dagcortez@uem.br.

RESUMO:

Schinus terebinthifolius Raddi, popularmente conhecida como aroeira-pimenteira ou pimenta-rosa, apresenta frutos ricos em óleo essencial, que é utilizado como antimicrobiano, antioxidante, cicatrizante, antiinflamatório. O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades leishmanicida, antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial extraído dos frutos da pimenta rosa. O óleo essencial (OE) foi extraído dos frutos de *Schinus terebinthifolius* por hidrodestilação e analisado por CG/EM, testou-se sua atividade contra as formas promastigota das espécies de *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, e contra a forma amastigota intracelular contra a forma de *L. infantum*. A atividade leishmanicida foi avaliada em termos da concentração inibitória de crescimento para 50 % de protozoários (IC50). A citotoxicidade foi realizada com macrófagos peritoneais murinos de camundongos suíços em termos das concentrações citotóxicas para 50 % de macrófagos (CC50). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de de microdiluição em caldo (MIC), calculando a concentração inibitória e mínima (MIC). Os resultados mostraram que os principais constituintes ativos do óleo são sequiterpenos oxigenados (79,50%), monoterpenos hidrocarbonetos (17,04%), sequiterpenos hidrocarbonetos (3,45%). O OE apresentou uma forte atividade antimicrobiana para bactérias gram positivas

com CIM de 0,19 µg/mL, 1,25 µg/mL, 6,25 µg/mL frente ao *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* inclusive podendo atuar em microrganismo MRSA (acrônimo em inglês para *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus* respectivamente. O OE também apresentou boa atividade leishmanicida com valores de IC₅₀ de 41,4 µg/mL, 42,4 µg/mL e 53,4 µg/mL para as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, respectivamente e IC₅₀ de 46,12 µg/mL pra a forma amastigota de *Leishmania infantum*. Também foi realizado o ensaio para citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e o CC₅₀ foi de 284±3,0 µg/mL.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius* Raddi; epi-α-cadinol, sesquiterpenos oxigenados, antibacteriano, antileishmania, citotoxicidade.

ABSTRACT:

Schinus terebinthifolius Raddi, popularly known as mastic-pepper or pepper pink, presents fruits rich in essential oil, which is used as an antimicrobial, antioxidant, healing, anti-inflammatory. This study aimed to evaluate the leishmanicide activities, antimicrobial and cytotoxic essential oil extracted from pink pepper fruit. The essential oil (EO) was extracted from the fruits of *Schinus terebinthifolius* by hydrodistillation and analyzed by GC / MS, we tested its activity against forms promastigota species of *L. Amazonian*, *L. braziliensis* and *L. infantum*, and against the form intracellular amastigote against the form of *L. infantum*. The antileishmanial activity was assessed in terms of inhibitory concentration 50% growth of protozoa (IC₅₀). Cytotoxicity was performed with murine peritoneal macrophages Swiss mice in terms of the 50% cytotoxic concentrations of macrophages (CC₅₀). The antimicrobial activity was determined by the microdilution broth method (MIC) by calculating the inhibitory concentration and minima (MIC). The results showed that the major constituents are oil sesquiterpenos active oxygen (79.50%), hydrocarbon monoterpenes (17.04%), sesquiterpenos oil (3.45%). The OE showed a strong antimicrobial activity against gram-positive bacteria with MIC of 0.19 mg / mL, 1.25 mg / mL, 6.25 mg / mL against *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* including being able to act in microorganism MRSA

(*Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*) respectively. The OE also showed good leishmanicidal activity with IC₅₀ values of 41.4 mg / mL, 42.4 mg / ml and 53.4 ug / ml for promastigotes of *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* respectively, and IC₅₀ 46.12 mg / mL for the amastigote form of *Leishmania infantum*. The test was also conducted for cytotoxicity in murine peritoneal macrophages and CC₅₀ was 284 ± 3.0 mg / mL.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, uma doença infecciosa, não contagiosa, endêmica em vários países e continentes mundiais, chegando a atingir mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Caracteriza-se por um com alto índice endêmico e altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em populações da África, Ásia e América Latina (Dujardin, 2006). A cada ano surgem 2 milhões de novos casos de *Leishmania cutanea* e 0,5 milhões de *Leishmania visceral* no mundo (Soares et al., 2007 e Who, 2014). No Brasil a prevalência de leishmioses por todo o território nacional, sendo à maior incidência da *Leishmania visceral* em humanos na região Nordeste. No Paraná a doença é encontrada nas bacias do rio Ivaí e Pirapó (Monteiro, 2012 e Ministério da Saúde, 2014).

A forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é vetorial, através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae (Gontijo e Carvalho, 2003).

O tratamento é realizado com medicamentos antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de alto custo, difícil administração e podem causar resistência ao parasita. E também causam vários efeitos colaterais como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepatites (Bezerra et al., 2006). Em virtude desses efeitos, tem-se a necessidade de se desenvolver novos estudos que possam contribuir para o tratamento da Leishmaniose.

Outro problema de saúde atual são as infecções por bactérias, que vem cada dia mais se mostrando resistentes aos tratamentos disponíveis, que gera problemas para sociedade, saúde pública e também para economia (Celiktas et al., 2007). Em face à resistência destes microrganismos aos antibióticos tradicionais, as últimas décadas tem sido marcada por estudos antimicrobianos de origem vegetal, que tem em seus óleos essenciais uma fonte de ativos com ação antimicrobiana (Pelissari et al., 2010; Rebelo et al., 2012) e antileishmania.

Os óleos essenciais vêm sendo usados tanto no tratamento como na prevenção de várias doenças (Demirci et al., 2008; Cávar et al., 2008; Diplock et al., 1998). Em fitoterapia os óleos essenciais possuem atividades antimicrobiana, espasmolítica, antiviral, anticarcinogênica, antiinflamatória, antiparasitológica e antioxidante (Cansian et al., 2010; Costa et al., 2009; Cowan., 1999).

Diante de toda biodiversidade natural existente, encontra-se a espécie vegetal *Schinus terebinthifolius* Raddi, pertencem à família botânica Anacardiaceae, popularmente conhecida como aroeira vermelha, aroeira-pimenteira ou pimenta-rosa (Barbosa et al., 2007). É representada por 70 gêneros e cerca de 600 espécies de árvores ou arbustos (Crônquist, 1981; Corrêa, 1984; Fleig, 1987). Seus frutos são ricos em óleos essenciais (Cole, 2008).

Frente à necessidade da obtenção de novos produtos terapêuticos, que complementem ou substituam o tratamento das Leishmanioses e das doenças bacterianas, o presente trabalho teve por objetivo analisar o óleo essencial de *S.terebinthifolius*, e avaliar sua ação leishmanicida, citotóxica e antimicrobiana, para considerar seu respectivo uso terapêutico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DA ESPÉCIE VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A espécie vegetal foi coletada no mês de fevereiro de 2013, na cidade de Dourados – Mato Grosso do Sul com coordenadas de 22°11'43.7"S e 54°56'08.5"W

e altitude de 452 m. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, sob número de registro 4602.

2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Foram utilizados 50g de frutos de *S.terebinthifolius* secos a temperatura ambiente (média 23,6°C) e 2500ml de água destilada, os frutos foram pulverizados para proceder a extração. A técnica utilizada foi a hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, por um período de 3 horas, e o volume do óleo obtido 1,6 ml.

2.3 ANÁLISE QUÍMICA POR CG/EM

A identificação dos componentes químicos do óleo essencial da *S. terebinthifolius* foi realizada por cromatografia gasosa (Agilent, 7890 B) acoplada à espectrometria de massas (Agilent 5977A MSD) utilizando uma coluna HP-5 MS UI Agilent (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm). As condições de análises foram: temperatura do injetor 260 °C com razão de divisão de fluxo split 1:30, temperatura do forno da coluna iniciou em 60 °C por 2 minutos, depois 2 °C/min até 180 °C permanecendo por 4 minutos e aquecimento de 10 °C/min até 260 °C por mais 10 minutos, a linha de transferência foi mantida a 260 °C. O gás He foi utilizado como gás de arresta com fluxo de 1 ml/min.

2.4 ATIVIDADE ANTILESHMANIA E CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

2.4.1. Parasitos

Foram utilizados para os ensaios *in vitro* parasitos da espécie *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *Leishmania braziliensis* (MCAN/BR/98/R619), *Leishmania*

infantum (MHOM/MA67ITNAB263). As diferentes espécies de *Leishmania* foram mantidas a 26 °C em meio Schneider (Sigma, Sant Louis, EUA), acrescido de 10 ou 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, até a quinta passagem.

2.4.2. Atividade *in vitro* do extrato

2.4.2.1 Atividade antipromastigota

A atividade antipromastigota foi realizada com adaptações da metodologia de Denizot e Lang (1986), do frutos de pimenta rosa promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* mantidas em meio Schneider, foram incubadas com concentrações crescentes do óleo (diluído em DMSO) por 72 horas a 26°C. Estes ensaios foram realizados em triplicata em placas de 96 poços, fundo chato, (Falcon Co, Franklin Lakes, EUA). A atividade leishmanicida foi avaliada, adicionando a cada poço 22µl de Alamar Blue (resazurina). Um ensaio colorimétrico baseado na redução da resazurina não fluorescente à resorufina que fluoresce em vermelho. Células viáveis realizam esta conversão continuamente gerando uma medida quantitativa da viabilidade que foi mensurada por fluorimetria (Spectra Max GEMINI XPS- Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) com excitação a 560nm e a 590nm emissão. O cálculo do IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento) foi determinado em relação ao controle por análise de regressão logarítmica no *GraphPad Prism* 5.0 (Denizot e Lang,1986).

2.4.2.2 Atividade antiamastigota

A atividade antiamastigota foi realizada conforme metodologia descrito anteriormente (Da Cunha-Júnior et al., 2011), macrófagos residentes de camundongos suíços foram obtidos por lavagem peritoneal com 10mL de meio RPMI gelado (Sigma, Sant Louis, USA). O lavado peritoneal foi ajustado à concentração de 1x10⁶ macrófagos/mL e plaqueado em câmaras LAB-TEK (Nunc, nova Iorque, USA). Após 1 hora, as culturas foram lavadas para remoção das células não aderentes. As células restantes foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ com

promastigotas de *L. amazonensis* na razão de 3:1 e *L. infantum* na razão de 5:1. Após 4 horas, as câmaras foram lavadas, para remover os parasitos livres. As células foram incubadas com o extrato de *Pimenta rosa* em diferentes concentrações de 0 a 100µg por 72 horas a 37°C e 5% CO₂. Após o período de incubação, a atividade foi avaliada microscopicamente, corando-se as câmaras com Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil) e contando no mínimo 100 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF): IF = % células infectadas X número de amastigotas/número total de macrófagos. O cálculo do IC₅₀ foi feito por análise de regressão logarítmica no *GraphPad Prism 5.0* (Mendez et al., 2009).

2.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE

A citotoxicidade do óleo essencial foi avaliada colorimetricamente com *Alamar Blue* (resazurina), com adaptações da metodologia de (Mendez et al. 2009). Inicialmente, macrófagos peritoneais murinos de camundongos suíços foram plaqueados (1×10^6) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Posteriormente foram incubados por uma hora a 37°C com 5% CO₂, a cultura foi lavada e o extrato de *Pimenta rosa* foi adicionado em diferentes concentrações (0-500µg/mL) por 72 horas a 37°C. Como controle positivo macrófagos peritoneais murinos foram incubados com 0.1% de Triton-X-100. Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e adicionado 200µL de PBS contendo 22µl de *Alamar Blue*. Após o período de 3h de incubação, a viabilidade foi mensurada por fluorimetria (Spectra Max GEMINI XPS- Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) com excitação a 560nm e a 590nm emissão. O cálculo do LD₅₀ (dose letal mediana) foi determinado em relação ao controle por análise de regressão logarítmica no *GraphPad Prism 5.0*. O índice de seletividade foi calculado pela fórmula LD₅₀/IC₅₀ amastigota intracelular (Torres-Santos et al., 1999).

2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os microrganismos utilizados neste ensaio, incluíram linhagens de American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S.aureus* MRSA ATCC 43300 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Bacillus cereus* ATCC 11778).

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando ensaio de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, em triplicata, seguindo as orientações do Clinical and Laboratory Standards Institute (Clsi, 2012). Foi realizada a diluição seriada do óleo essencial, nas concentrações de 100 a 0,09ug / ml. Utilizando o meio Mueller Hinton Broth cátion-ajustado (CAMHB), foram preparadas concentrações de 100-0,02 ug / ml. A menor concentração de óleo que inibiu o crescimento bacteriano foi observada após a incubação e foi registrada como a concentração inibitória mínima (MIC).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA

O OE apresentou coloração amarelo claro com um rendimento de 2,9% e densidade 0,9469g/ml, em um tempo de extração de três horas. O dado obtido em relação ao rendimento foi inferior a 4,65% encontrados na literatura Barbosa et al. (2007), com o mesmo tempo de extração. Em um outro estudo o rendimento alcançado de 2,66%, foi compatível ao presente trabalho, porém não foi relatado o tempo de extração (Affonso et al., 2012).

Dezessete compostos foram identificados mostradas na (Tabela 1) e (Fig 1). Estes compostos foram identificados pela comparação dos espectros obtidos por CG/EM e por comparação com os dados da literatura (Adams, 2007). O óleo essencial de *S. terebinthifolius* constitui-se de uma mistura complexa de terpenóides

classificados: sequiterpenos hidrocarbonetos (3,45%), monoterpenos hidrocarbonetos (17,04%) e sequiterpenos oxigenados (79,50%). Os compostos majoritários encontrados foram: epi- α -cadinol (32,92%), farnesol (19,90%), α bisabolol (13,50%), δ -3-carene (10,71%), α cadinol (8,67%), α pinene (6,33%).

Em estudos conduzidos por Barbosa et al. (2007) com os frutos da pimenta rosa, relataram como composto majoritário δ - 3 careno (29,22%), β felandrene (18,08%), α pinene (12,94%), D- germacreno (3,09%), e encontrou como constituintes monoterpenos (90%) e sequiterpenos (10%) corroborando com este estudo. Ainda Affonso et al. (2012), encontrou em seu estudo α fencheno (20,75%), β pineno (10,11%) e limoneno (20,8%). Estas diferenças de constituintes justificam-se a estímulos decorrentes do ambiente na qual a planta se encontra e também a fatores genéticos (Moraes et al., 2002).

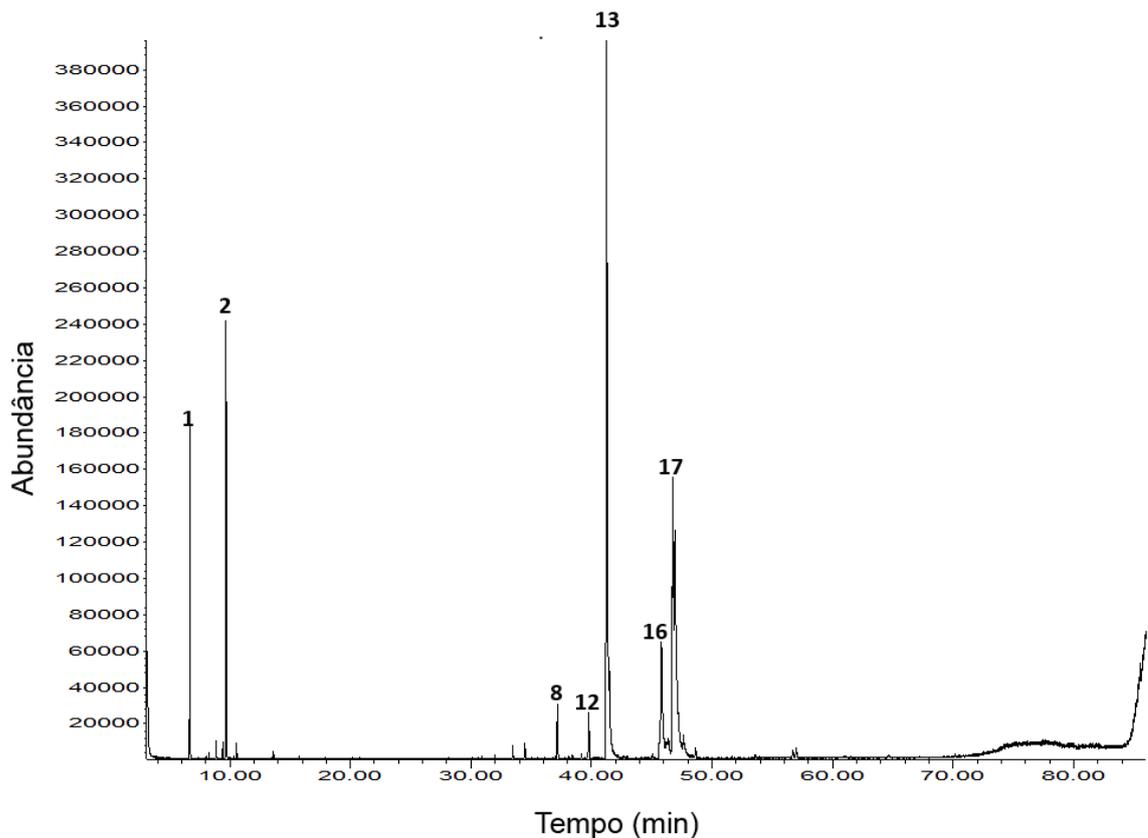


Figura 1: Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *S. terebinthifolius*. Onde 1 = α - pinene, 2= β -pinene, 8= gama-murolene, 12= selina-3,7 (11)-diene, 13= epi- α -cadinol 16= α -bisabolol, 17= (2E,6Z) farnesol.

Tabela 1: Composição química e área (%) óleo essencial de *S. terebinthifolius*

Composição		IR calcul.	IR Literat.	Área %	Métodos de Identificação
Monoterpenos hidrocarbonados					
1	α - pinene	900	939	6,33	a, b, c
2	β -pinene	973	974	t	a, b, c
3	β -myrcene	978	988	t	a, b, c
4	δ -3- carene	1011	1008	10,71	a, b, c
5	Limonene	1031	1024	t	a, b, c
Sesquiterpenos hidrocarbonados					
6	β -caryophyllene	1405	1417	t	a, b, c
7	gama-elemene	1412	1434	t	a, b, c
8	gama-muurolene	1430	1478	1,90	a, b, c
9	δ -selinene	1431	1492	t	a, b, c
10	α -muurolene	1538	1500	t	a, b, c
11	α -farnesene	1543	1505	t	a, b, c
12	selina-3,7 (11)-diene	1546	1545	1,55	a, b, c
Sesquiterpenos oxigenado					
13	epi- α -cadinol	1655	1638	32,92	a, b, c
14	α -eudesmol	1656	1649	4,51	a, b, c
15	α -cadinol	1679	1652	8,67	a, b, c
16	α -bisabolol	1685	1685	13,50	a, b, c
17	(2E,6Z) farnesol	1785	1722	19,90	a, b, c
Total Identificado		100%			
Monoterpenos hidrocarbonados				17,04%	
Sesquiterpenos hidrocarbonados				3,45%	
Sesquiterpenos oxigenados				79,50%	

Métodos de Identificação: ^aIR calculado- Índice de retenção calculado utilizando n-alcenos C7– C25 em coluna DB-5 (fenilmetilsiloxane 5%). ^bIR literatura-Índice de retenção relativo encontrado na literatura em coluna capilar DB5 e comparação dos Índices de Retenção e/ou dos Espectros de Massas com a Literatura (ADAMS, 1995). ^cMS- Identificação baseada na comparação com os espectros de massa da espectroteca Wiley 275 libraries n.i-não identificados; ^A Compostos listados em ordem de eluição pela coluna DB-5 (fenilmetilsiloxane 5%). t= traço

3.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de *S. terebinthifolius* são mostrados na (Tabela 2). Foi possível observar atividade contra as formas promastigostas de todas as espécies de *Leishmania* testadas. Sendo a *Leishmania infantum*, a espécie que desenvolve a forma visceral da doença, considerada a mais grave, avaliou-se a atividade frente a forma amastigota intracelular, apresentando IC₅₀ de 46,12 µg/ml.

Os óleos essenciais se mostram eficazes tanto na prevenção como no tratamento das doenças parasitárias, por possuírem propriedades como baixa densidade e rápida difusão através das membranas celulares em decorrência da sua lipossolubilidade, podendo melhorar a inserção intracelular dos componentes ativos do óleo essencial nos parasitas (Anthony e Smith, 2005).

Em relação a citototoxicidade realizada em macrófagos peritoneais murinos, foi observado uma resposta superior para o óleo essencial quando comparada com o fármaco pentamidina (Tabela 2). A Citotoxicidade e a atividade frente a forma amastigota intracelular de *Leishmania infantum* foram usados para determinar o índice de seletividade. Os resultados obtidos indicam que o óleo essencial é 6,15 vezes mais seletivo para o protozoário do que para a célula humana, este valor é superior ao apresentado pela pentamidina, que se mostrou 2,06 vezes mais seletivo para o protozoário. Dessa forma, esses resultados são de grande importância para futuras pesquisas no desenvolvimento de novas drogas com ação leishmanicida.

Braga et al. (2007), analisaram a atividade leishmanicida do extrato bruto da aroeira contra a forma promastigota do protozoário, e verificaram um IC₅₀ de 55 µg/ml para a espécie *L. amazonensis* e um IC₅₀ > 250 µg/ml para *L. chagasi*, sendo o resultado bastante diferente para as espécies. Neste trabalho, realizado com o óleo essencial dos frutos, não foi grande a diferença de resultado entre as formas cutâneas e visceral testadas.

Moura-Costa et al. (2012), avaliaram a atividade do extrato de *S. terebinthifolius* frente a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, encontraram valores inferiores aos nossos resultados já que obtiveram um IC₅₀ de 201±25 µg/ml para o extrato aquoso e um IC₅₀ de 688±88 µg/ml para o extrato

hidroalcolico a 50%. O grupo avaliou também a citotoxicidade do extrato em células Vero e obtiveram CC_{50} de $51 \pm 23 \mu\text{g/ml}$ para o extrato aquoso e um CC_{50} de $>100 \mu\text{g/ml}$ para o extrato hidroalcolico a 50%.

Tabela 02: Atividade leishmanicida sobre as formas promastigota e amastigota em espécies de *Leishmania* e atividade citotóxica do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus Terebinthifolius* Raddi) em macrófagos peritoneais.

Amostra	Promastigota (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)			Amastigota intracelular (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	Macrófagos peritoneais murinos (CC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	Índice de seletividade (IS) (CC_{50}/IC_{50} em amastigota intracelular)
	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>		
<i>Schinus Terebinthifolius</i>	$42,4 \pm 0,7$	$41,4 \pm 1,4$	$53 \pm 4,0$	$46,12 \pm 5,03$	$284 \pm 3,0$	6.15
Pentamidina	$2,84 \pm 0,09$	$0,9 \pm 0,0$	$3,3 \pm 0,12$	$2,43 \pm 0,0$	$5,03 \pm 1,25$	2.06

Valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. CC_{50} : concentração citotóxica em 50%; IC_{50} :concentração inibitória em 50%; IS: índice de seletividade (CC_{50}/IC_{50} em amastigota intracelular).

3.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados obtidos na avaliação antibacteriana do óleo essencial dos frutos de *S.terebinthifolius* são mostrados na (Tabela 3). Forte atividade antimicrobiana foi observada em bactérias Gram positivas, sendo a menor CIM detectada em *Bacillus cereus* ($0,19 \mu\text{g/mL}$), um importante bacilo Gram positivo formador de esporo que pode causar infecções gastrintestinais e oculares em humanos e menos frequentemente diversas outras infecções clínicas como septicemia, pneumonia e meningite, particularmente em pacientes imunocomprometidos (Ramarao e Sanchis, 2013).

O OE mostrou também ação antibacteriana frente os cocos Gram positivos mais comumente relacionados à infecção em humanos, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, com CIM de $6,25 \mu\text{g/mL}$ e $1,56 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Este resultado evidencia o potencial terapêutico do óleo estudado, inclusive podendo atuar em microrganismos multirresistentes como os MRSA (acrônimo em inglês para

Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus), já que a CIM detectada para o isolado MRSA testado foi idêntica ao *S. aureus* ATCC sensível. Em nosso estudo não foi detectada atividade inibitória do OE, nas concentrações utilizadas, contra as bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*), (Tabela 3).

Segundo Duarte et al. (2005) e Aligiannis et al. (2001), pode-se classificar a atividade antimicrobiana de materiais vegetais, segundo os resultados da CIM, podendo a atividade antimicrobiana do material ser considerado como forte, moderada ou fraca, assim, óleos ou extratos que apresentem CIM até $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, entre $0,6$ e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e acima de $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. Desta maneira, o óleo essencial de *S. terebinthifolius* apresentou ação antimicrobiana forte contra os *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 e ATCC 43300-MRSA), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778).

Outros pesquisadores testaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial, com resultados muito variáveis, provavelmente relacionados às diferenças na parte da planta utilizada, metodologia empregada na extração ou nos ensaios antimicrobianos. Silva et al. (2010), analisaram a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido das folhas de *S. terebinthifolius*, e observaram uma variação da CIM de $78,1$ a $1250 \text{ } \mu\text{g/ml}$ frente isolados de *Staphylococcus* spp. Com esse resultado, podemos inferir que o óleo essencial do fruto é mais eficaz para *Staphylococcus aureus* quando comparado ao óleo obtido das folhas, uma vez que detectamos um valor bem inferior de CIM ($6,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$) para os dois isolados testados.

Em um estudo realizado por El-Massry et al. (2009), a atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato das folhas de *S. terebinthifolius* foi avaliada e os resultados obtidos indicam que o extrato de diclorometano mostrou forte inibição do crescimento de *P. aeruginosa* (MIC de $550 \text{ } \mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus aureus* ($600 \text{ } \mu\text{g/mL}$), *Aspergillus niger* ($850 \text{ } \mu\text{g/mL}$), *Aspergillus parasiticus* ($800 \text{ } \mu\text{g/mL}$), e *Candida albicans* ($750 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Já o óleo essencial e o extrato etanólico mostrou atividade moderada. Santos et al. (2007), verificaram a ação do óleo essencial das folhas sobre fungos, e o mesmo não apresentou efeito fungicida contra *Colletotrichum* spp. e *Fusarium* spp., porém inibiu o crescimento dos fungos utilizando diluições superiores a 10% do óleo para *Colletotrichum* spp. e inferiores a 10% para *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. e *Botrytis* spp. Na análise microbiológica do extrato da mesma planta, cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e do

Bacillus cereus (ATCC 11778) apresentaram-se sensíveis à ação antimicrobiana do extrato alcoólico.

Já o extrato aquoso não apresentou poder inibitório em nenhuma das cepas testadas, não sendo observados halos inibitórios em nenhuma das placas produzidas (Degáspari et al., 2005). Estudos realizados por Freires et al. (2010), analisando as bactérias da cavidade bucal, que fazem parte do biofilme dentário, detectaram que as linhagens bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* mostraram-se susceptíveis à ação do extrato.

Alguns autores sugerem que como os óleos essenciais são constituídos por misturas complexas de compostos lipofílicos, a sua lipofilicidade lhe permite permear pelos lipídeos da membrana da célula bacteriana e mitocôndrias, desestabilizando a estrutura celular e tornando-as mais permeáveis, favorecendo a penetração e consequente ação antimicrobiana por instabilidade na membrana plasmática gerando a ruptura da célula (Carson et al., 2002; Ultee et al., 2002; Burt, 2004).

Tabela 03: Atividade antimicrobiana dos valores do MIC do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Microrganismos testados	MIC ($\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Dogras padrões	
		Meropenen	Ciprofloxacino
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>100	< 0,12	< 0,12
<i>Pseudomonas aruginosa</i> ATCC 27853	>100	0,5	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	6,25	0,03	< 0,12
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1,56	2	1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,19	Nd*	Nd*
<i>S.aureus</i> ATCC 43300 MRSA	6,25	Nd*	Nd*

Valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *Nd, valor não determinado.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* demonstrou atividade antimicrobiana frente aos *B.cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis* e antileishmania frente a *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. infantum* e baixa citotoxicidade em macrófagos peritonias de ratos, sugerindo que esta espécie vegetal tem um grande potencial em substâncias com atividades biológicas, com potencial a ser explorado no desenvolvimento de novas drogas no tratamento da Leishmania e antibióticos. Foi relatado pela primeira vez atividade antileishmania do óleo essencial desta espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a professora Dr Dr. Maria do Carmo Vieira (UFGD) pela identificação da espécie vegetal. Esse estudo foi suportado pela CAPES, Fundação Araucária e CNPq.

REFERÊNCIAS

Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by gas Chromatography/ quadrupole Mass Spectross. Allured Carol Stream IL., USA.

Affonso, C.R.J., Rozevert, M.F., Janylla, M.G., Carvalho, M.C., Sidney, G.L., Souza, J.J., Lima Carvalho, M.C., Sidney, G.L., Souza, J.J., Lima, A.Z., Fernandes, C.M., Fernandes, M., Zanini, S.F., 2012. Effects of the essential Oil from of *Schinus terebinthifolius* Raddi. J. Braz. Chem. Soc. 23, 180-185.

Aliyiannis, N., Kalpotzaks, E., Mitaku, S., Chinou, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40, 4168-70.

Anthony, J.P., Fyfe, L., Smith, H., 2005. Plant active components – a resource for a antiparasitic agentes ?. Trends Parasitol. 21, 462.

Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J., Clemente, A.D., Paula, V.F., Ismail, F.M. D., 2007. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. Química Nova. 30, 1959–1965.

Bezerra, J.L., Costa, G.C., Lopes, T.C., Carvalho, I.C.D.S., Patrício, F.J., Souza, S.M., Amaral, F.M.M., Rebelo, J.M.M., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., 2006. Avaliação da atividade *leishmanicida in vitro* de plantas medicinais, Revista Brasileira de Farmagnosia. 16, 631-637.

Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., Matos, M. DE.O., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacol.* 111, 396-402.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vig_epi_vol_1.pdf. Acesso em: 6 fev. 2014.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 94, 223–253.

Cansian, R.L., Mossi, A.J., Oliveira, D., Toniazzo, G., Treichel, H., Prael, N., Astolfi, V., Serafini, L.A. 2010. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*), *Ciência e tecnologia de Alimentos.* 378-384.

Carson, C.F., Mee, B.J., Riely, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial and Chemotherapy*, 46, 1915-1920.

Ćavar, S., Maksimovic, M., Solic, M.E., Jerkovic- Mykic, A., Besta, R., 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry.* 111, 648-653.

Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T & Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial activity of methanolic extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry.* 100, 553-559.

CLSI- Clinical Laboratory Standards Institute., 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M7-A9, Wayne, PA.

Cole, E.R., 2008. Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI) e sua eficácia no combate ao dengue. Dissertation- Federal University of the Espírito Santo. Department of Chemistry, Center of Exact Sciences, Brazil.

Corrêa, M.P., 1985. Dicionário de Plantas úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, Instituto brasileiro de desenvolvimento Florestal, 1. 154.

Costa, E. V., Pinheiro, M. L. B., Silva, J. R. A., 2009. *Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of annona foetida* (ANNONACEAE), *Revista Quim. Nova.* 32, 78-81.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents, *Clin Microbiol Rev.* 12, 546-582

Crónquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, USA. 519.

Da Cunha-Júnior, E.F., Pacienza-Lima, W., Ribeiro, G.A., Netto, C.D., Cantocavalheiro, M.M., Silva, A.J., Costa, P.R., Rossi-Bergmann, B., Torres-Santos, E.C., 2011. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1555–1559.

Degáspari, C.H., Waszczyński, N., Santos, R.J., 2005. Das Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica* ISSN: 1518-5192, Curitiba. 5, 83-90.

Demirci, F., Guven, K., Demerci, B., Dadandi, M.Y., Baser, K.H.C., 2008. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control.* 19, 1159-1164.

Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 89, 271-277.

Diplock, A. T., Hornstra, G., Koletzko, b., Roberfroid, M., 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition.* 80, 77-112.

Duarte, M.C., Figueira, G.M., Sartoratto, A. Rehder, V.L., Delarmelina, C., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 97, 305-311.

Dujardin, J-C., 2006. Risk factors in the spread of *leishmaniases*: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol.* 22, 4-6.

El- Massry KF, El-Ghorab Ah., Shaaban Ha, Shibamoto T., 2009. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J Agric Food Chem.* 57, 5265–5270.

Fleig, M., 1987. Anacardiaceae. *Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul. Boletim do Instituto de Biociencias.* 18, 42- 72.

Freires, I.A., Alves, L.A., Jovito, V.C., Castro, R.D., 2010. Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*. *Rev. Odontol. Bras. Central.* 20, 52.

Gontijo, B., Carvalho, M.L.R., 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 36, 71-80.

Mendez, S., Traslavina, R., Hinchman, M., Huang, L., green, P., Cynamon, M. H., Welch, J.T., 2009. The antituberculosis drug pyrazinamide affects the course of

cutaneous leishmaniasis in vivo and increases activation of macrophages and dendritic cells. *Antimicrob Ag Chemother.* 53, 5114-5121.

Monteiro,C.C., 2012. O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Luizomia longipalpes* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasite ao vertebrado pela picada. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós –graduação em Ciências da Saúde, Fiocruz- Centro de Pesquisa René Rachou.

Moraes Las., Facanall, R., Marques Mom., Ming L.C., Meireles M.A.A. 2002. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74:183-186.

Moura-Costa, G. F. , Nocchi, S. R. , Ceole, L. F. , Mello, J. C P., Nakamura, C.V., Dias-Filho.B.P., Temponi, L. G., 2012. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology.* 143, 631-638.

Pelissari, G.P., Pietro, R.C.L.R., Moreira, R.R.D., 2010. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium*. *Revista Brasileira de Farmagnosia.* 20, 70-74.

Ramarao, N., Sanchis, V., 2013. The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus Cereus*: A Review. *Toxins.* 5, 1119-1139.

Rebelo,R.A.,Santos,T.G.,Guedes,A.,Dalmarco,E.M.,Gasper,A.L.,Cruz,R.C.B., Schimit,A.P.,Cruz,A.B., Nunes,R.K.,Steindel,M., 2012. Composição Química e Avaliação de atividade Antimicrobiana do óleo essencial das Folhas de *Piper malacophyllum* (C> PRESL.) C.DC. *Quim.Nova.* 35, 77-481.

Santos, F.N, Borja-Cabrera, G.P., Miyashiro, L.M., Grechi, J., Reis, A.B.,Moreira, M.A.B.; Mortins Filho, O.A., Luvizotto, M.C.R., Menz, I., Pessoa, L.M., Gonçalves, P.R., Palatinik, M., Palatinik-de-Souza, C.B., 2007. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine.* 25, 6176–6190.

Silva, A.G., Almeida, D.L., R., S.N., Bento, A.C., Scherer, R.; Ramos, A.C., Cruz, Z. M.A., 2010.The essential oil of Brazilian pepper *Schinus terebinthifolius* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasites & Vectors.* 3, 79.

Soares,D.C, Pereira,C.G, Meireles,M, Saraiva,E.M., 2007. “*Leishmanicidal* activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*,” *Parasitology International.* 56, 135–139.

Torres-Santos,E.C.,Moreira,D.L.,Kaplan,M.A.C.,Meirelles,M.N., Rossi-Bergaman, B., 1999. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington. 43, 1234-1241.

Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 1561–1568.

World Health Organization., 2014. “Report on the scientific working group on leishmaniasis,” February .<http://www.who.int/tdr/>.

CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, podemos confirmar a eficácia do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, por meio das análises *in vitro* realizadas frente às diferentes espécies de *Leishmania* e bactérias. Com os resultados obtidos, podemos constatar que óleo poderá ser utilizado futuramente no tratamento de doenças parasitológicas e bacterianas, de modo que o mesmo poderá substituir ou complementar a terapêutica atual. Porém, há a necessidade de se realizar estudos *in vivo*, para definir mecanismo de ação, dose e potencial citotóxico do óleo que futuramente serão aplicados no tratamento em humanos.

REFERÊNCIAS

Amorim, M.M.R., Santos, L.C., 2003. Tratamento de vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 25, 95-102.

Bannerman, T. L., 2003. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that aerobically. *Man Clin Microbiol*. Washington DC.ed.8, 1, 384-404.

Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J., Clemente, A.D., Paula, V.F., Ismail, F.M. D., 2007. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Química Nova*, 30, 1959–1965.

Bennett, R.W., Bilay, W.B., 2001. *Bacillus cereus* In: Daunes FP, Ito K. *Compendium of methods for the microbiological. Encamination of Foods*, APHA, Washinton. ed..4, 311-316.

- Bertoldi, M.C., 2006. Atividade Antioxidante *in vitro* Da fração Fenólica das Oleorresinas e do Óleo Essencial de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Dissertação de Mestrado- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Cassettari, V. C., Strabelli, T., Medeiros, E., 2005. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? *Braz J Infect Dis.* 9, 1, 70-76.
- Cavalcanti, S., 2005. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Braz J Infect Dis.* 9, 1, 56-63.
- Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T. & Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial activity of methanosl extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry.* 100, 553-559.
- Corrêa, M.P., 1985. Dicionário de Plantas úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, Instituto brasileiro de desenvolvimento Florestal, 1. 154.
- Croft, S.L., Combs, G.H., 2003. Leishmaniasis currents chemotherapy and recente advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology.* 19502-508.508. Pub Med.
- Crónquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, USA. 519.
- Degásparl, C.H., Waszczyński, N., Santos, R.J., 2005. Das Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica* ISSN: 1518-5192, Curitiba. 5, 2, 83-90.
- El-Massry K.F., El-Ghorab A.H., Shaaban H.A., Shibamoto T., 2009. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J Agric Food Chem.* 57, 5265–5270.
- Fernandez, K.H.P., Mori, E.S., Silva, M.R., Pinto, C.S., 2008. Propagação vegetativa de Aroeira-Pimenta (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal-SP.* 30, 3, 853-856.
- Ferreze, M.V.G., Leopoldo, V.C., Andrade, D., Silva, M.F.I., Haas, V.J., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de cuidados intensivos? *Acta Paul Enferm,* 7-11.
- Fleig, M., 1987. Anacardiaceae. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Biociencias.* 18, 42- 72.
- Grevelink, S.A., Lerner, E.A., 1996. Leishmaniasis, *J. Acad Dermatol.* 34, 257-272.

- Guerra, M.U.M., Barreiro, M.L., Rodriguez, Z.M., Rubaiacaba, Y. , 2000. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). Revista cubana de plantas Medicinales. 5, 23-25.
- Kaper,J.B., Nataro,J.P., Mobley,H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Ver. Microbiol, 2, 123-140.
- León,J., Aponte,J.J., Rojas,R., Cuadr,D.I., Ayala,N., Toás.G., Guerrero.M., 2011. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Peru y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* Meticilina resistentes *Enterococcus faecalis* Vancomicina resistentes, Med Salud Publica. Peru.28, 237-246.
- Lenzi, M., Orth, A. I., 2004. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis – SC, Brasil. Rev. Bras. Frutic, 26, 198-201.
- Lorenzi, H, Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum.
- Martinez, M.J., Alonso- González,N., Badell, J.B., 1996. Actividad antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). Rev. Cubana Plant Med (Habana). 1, 33-40.
- Michalick, M.S.M., Neves D.P., Melo, A.L., Genaro O., Linardi P.M., 2003. Gênero Leishmania In:Parasitologia humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 31-35.
- Moure, A., 2001. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 72, 145-171.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A., 2000. Microbiologia médica, Park SB, Lee SE, Guanabara, Koogan Rio de Janeiro.
- Oliveira, C. J., Araujo, T. L., 2007. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. Revista Eletrônica de Enfermagem. 9, 1, 93-105.
- Palazzo, J.T.J., Both, M.C., 1993. Flora ornamental brasileira: um guia para o paisagismo ecológico. Sagra, DC Luzzato. Poeto Alegre. 184.
- Rath, S., Trivelin, L.A., Imbrunito, T.R., Daniela, M.T., Marcelo, N.J., Percy, C.M., 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose, Estado da arte. Quím. Nova. 26, 550-555.
- Sereno, D., Hozmuller, P., Mangot, I., Curry, G., Quaiassi, A., Lemesre, J.P., 2000. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2064-2069.
- Soares-Bezerra, R.J., Leon, L., Genestra, M., 2004. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Rev. Bras. Cienc. Farm. 40, 139-149.

Sokmen, A. 2004. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control. 15, 8, 627-634.

Teixeira, L.M., Merquior, V.L.C., Trabulsi, L.R., 2004. *Enterococcus faecalis*. In: Microbiologia. Atheneu. São Paulo. 215-217.

Yunes, R. A., Pedrosa, R. C., Cechunel Filho, V., 2001. Pharmaceuticals and phytopharmaceuticals and phytotherapies in Brazil. Química Nova. 24, 1, 147-152. ISSN 0100-4042. Jan/Fev.

ANEXO