

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa
(*Schinus terebinthifolia* Raddi): Perfil químico e atividade
antimicrobiana de extratos contra bactérias hospitalares**

**Residues from the pink pepper (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing
industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against
hospital bacteria**

Rodrigo Borges de Araujo Gomes

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2019**

Rodrigo Borges de Araujo Gomes

Resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa
(*Schinus terebinthifolia* Raddi): Perfil químico e atividade
antimicrobiana de extratos contra bactérias hospitalares

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Centro de
Ciências Exatas da Universidade Federal do
Espírito Santo como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Química

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química de Produtos
Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto
Filgueiras

VITÓRIA
2019

“Resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolia* Raddi): Perfil químico e atividade antimicrobiana de extratos contra bactérias hospitalares”

Rodrigo Borges de Araujo Gomes

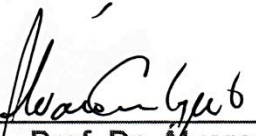
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovada em 18/02/2019 por:


Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador


Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador


Prof. Dr. Almir Andreão
Instituto Federal do Espírito Santo


Prof. Dr. Alvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

- G633r Gomes, Rodrigo Borges de Araujo, 1989-
Resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa
(Schinus terebinthifolia Raddi) : Perfil químico e atividade
antimicrobiana de extratos contra bactérias hospitalares /
Rodrigo Borges de Araujo Gomes. - 2019.
73 f. : il.
- Orientador: Ricardo Machado Kuster.
 Coorientador: Paulo Roberto Filgueiras.
 Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.
1. Schinus terebinthifolia. 2. Pimenta rosa. 3. Resíduos. 4.
Atividade antimicrobiana. 5. Compostos fenólicos. I. Kuster,
Ricardo Machado. II. Filgueiras, Paulo Roberto. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Exatas. IV. Título.

CDU: 54

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as bênçãos recebidas e por Ele estar sempre no controle da minha vida.

À minha amada esposa que esteve comigo em todos os momentos me dando forças e inspiração para seguir em frente.

À minha família por todo apoio, compreensão e orações.

Ao meu orientador Ricardo Machado Kuster e ao meu coorientador Paulo Roberto Filgueiras pela oportunidade de trabalharmos juntos e pela competência demonstrada na orientação prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Almir Andreão e Álvaro Cunha Neto por participarem da banca avaliadora e por suas contribuições.

Ao Incaper, especialmente ao José Aires Ventura pelo fornecimento das amostras e auxílio no projeto de pesquisa.

À equipe do laboratório de cromatografia Cristina Luz, Larissa, Fernanda, Polianna, Letícia, Tamires, Dandara, Danielle, Joseli e aos colegas Nataly Gerhardt, Kézia Roncati, Regina Westphal e Lucas Martins pela excelente convivência e troca de experiências durante o período do mestrado.

À Erica Santana de Souza e aos professores da Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da UFES, Ana Paula Nunes e Ricardo Schuenck pela assistência na realização dos ensaios microbiológicos.

À equipe do laboratório de espectrometria de massas pelo apoio na realização das análises.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFES e ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo pelo enriquecimento científico e suporte técnico.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo que me concedeu a licença para realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Não to mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o
Senhor, teu Deus, é contigo por onde quer que andares.”

(Josué 1:9)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.	19
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi no Brasil (Adaptado de Silva-Luz e Pirani, 2015).	19
Figura 3. Composição química de Creme Antissinais da linha Chronos Natura®.....	21
Figura 4. Medicamento fitoterápico e sabonete íntimo que contém <i>S. terebinthifolia</i>	21
Figura 5. Estruturas dos principais compostos fenólicos encontrados em <i>S. terebinthifolia</i>	23
Figura 6. Estruturas dos biflavonoides identificados em <i>S. terebinthifolia</i>	24
Figura 7. Ácido masticadienoico e schinol.	25
Figura 8. Preparo dos extratos dos resíduos e das cascas dos frutos.	32
Figura 9. Cromatograma do extrato hexânico dos resíduos.	38
Figura 10. Principais mono e sesquiterpenos identificados no extrato hexânico dos resíduos.	41
Figura 11. Cromatograma do extrato diclorometânico dos resíduos.	42
Figura 12. Cromatograma do extrato diclorometânico esterificado.	43
Figura 13. Comparação entre os cromatogramas obtidos dos extratos diclorometânico e diclorometânico esterificado.	44
Figura 14. Espectros de massas ESI (-) FT-ICR do extrato diclorometânico.	45
Figura 15. Espectros de massas ESI (-) FT-ICR MS: (A) Extrato metanólico, (B) Extrato hidroetanólico dos resíduos, (C) Extrato hidroetanólico das cascas dos frutos.	47
Figura 16. ESI (-) MS/MS – Proposta de fragmentação dos íons <i>m/z</i> 599 (A) e 615 (B).	50
Figura 17. Fragmentação obtida para as galoilglicosos. (*Identificado apenas na fragmentação).	51
Figura 18. Fragmentação obtida para os ácidos galoilchiquímicos.	52
Figura 19. ESI (-) MS/MS – Proposta de fragmentação dos íons <i>m/z</i> 331 (A), 483 (B), 939 (C), 325 (D) e 629 (E).	53
Figura 20. ESI (-) MS/MS – Proposta de fragmentação dos íons <i>m/z</i> 335 (F), 349 (G), 343 (H) e 353 (I).	54

Figura 21. Espectros dos extratos preparados com metanol, etanol, água e acetona.

.....55

Figura 22. Reação entre o solvente (metanol ou etanol) e um tanino hidrolisável com maior grau de galoilação. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 15 cepas clínicas utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
Tabela 2. Lista de antimicrobianos testados para confirmação fenotípica do perfil de susceptibilidade.	35
Tabela 3. Extratos dos resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa. ..	37
Tabela 4. Composição química do extrato hexânico dos resíduos.....	40
Tabela 5. Composição química do extrato diclorometânico esterificado.	43
Tabela 6. Substâncias propostas para o extrato diclorometânico do resíduo após ESI (-) FT-ICR MS.	46
Tabela 7. Substâncias identificadas por ESI (-) FT-ICR MS nos extratos polares dos resíduos e das cascas dos frutos.	48
Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos dos resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa - <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI – Ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric pressure chemical ionization*)

APPI – Fotoionização à pressão atmosférica (*Atmospheric pressure photoionization*)

ATCC – *American Type Culture Collection*

CBM – Concentração bactericida mínima

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CI – Ionização química (*Chemical ionization*)

CID – Dissociação induzida por colisão (*Collision induced dissociation*)

CIM – Concentração inibitória mínima

DBE – Número de insaturações e anéis (*Double bond equivalent*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

ECF – Extrato hidroetanólico das cascas dos frutos

ED – Extrato diclorometânico

EH – Extrato hexânico

Ehid – Extrato hidroetanólico

EI – Ionização por impacto de elétrons

EM – Extrato metanólico

ESI (-) – Ionização por eletrospray (*electrospray ionization*) em modo negativo

ESI FT-ICR MS – *Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*

FT-ICR MS – Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)

ICR – Ressonância ciclotrônica de íons (*Ion Cyclotron Resonance*)

Incaper – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

IR – Índice de retenção

MALDI – Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)

MHb – Caldo Mueller-Hinton

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

OMS – Organização Mundial da Saúde

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RESBAC – Laboratório de Resistência Bacteriana

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RT – *Retention time*

TOF – Tempo de voo (*time-of-flight*)

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

VRE – *Vancomycin-resistant enterococci*

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

°C/min – Graus Celsius por minuto

cm – centímetro

Da – Dalton

g – grama

h – hora

kV – quilovolt

m – metro

m/z – razão massa/carga

mg/mL – miligrama por mililitro

min – minutos

mL – mililitro

mol.L^{-1} – mol por litro

s – segundo

v/v – volume/volume

μL – microlitro

RESUMO

Schinus terebinthifolia Raddi é uma planta utilizada na medicina popular no tratamento de várias doenças e possui diversos potenciais biológicos. Seu fruto é utilizado como condimento e possui alta demanda no mercado de especiarias. No presente estudo, extratos preparados a partir de resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa foram caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS). A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada contra cepas multirresistentes de origem hospitalar (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*) e cepas padrão (ATCC). As frações apolares apresentaram triterpenos como componentes principais e os extratos polares foram caracterizados por altos teores de compostos fenólicos, principalmente galotaninos, ácido gálico e flavonoides. A fração metanólica e o extrato hidroetanólico dos resíduos foram os mais ativos principalmente contra *S. aureus* (CIM 0,60 - 0,90 mg/mL), *E. faecium* e *E. faecalis* (CIM 1,20 - 2,10 mg/mL). Estes resultados demonstram a riqueza de compostos bioativos presentes nos resíduos e indicam uma possível aplicação desse material para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos com potencial contra bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolia*. Pimenta rosa. Resíduos. Atividade antimicrobiana. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Schinus terebinthifolia Raddi is a plant used in folk medicine in the treatment of various diseases and has several biological potentials. Its fruit is used as condiment and has high demand in the spice market. In the present study extracts prepared from residues from the pink pepper processing industry were characterized chemically by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS). The antibacterial activity of the extracts was evaluated against multidrug-resistant strains of hospital origin (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*) and standard strains (ATCC). The apolar fractions presented triterpenes as main components and the polar extracts were characterized by high contents of phenolic compounds, especially gallotannins, gallic acid and flavonoids. The methanolic fraction and the hydroethanolic extract of the residues were the most active mainly against *S. aureus* (MIC 0.60 – 0.90 mg/mL), *E. faecium* and *E. faecalis* (MIC 1.20 – 2.10 mg/mL). These results demonstrate the richness of bioactive compounds present in the residues and indicate a possible application of this material for the development of biotechnological products with potential against multidrug-resistant bacteria.

Keyword: *Schinus terebinthifolia*. Pink pepper. Residues. Antimicrobial activity. Phenolic compounds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Utilização de produtos naturais	17
1.2 Família Anacardiaceae.....	18
1.3 Espécie <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	18
1.4 Potencial biológico e principais metabólitos secundários encontrados em <i>S. terebinthifolia</i> Raddi	21
1.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	26
1.6 Espectrometria de massas	27
<i>1.6.1 ESI FT-ICR MS (Electrospray Ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry)</i>	<i>27</i>
1.7 Resistência bacteriana	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. METODOLOGIA.....	32
3.1 Obtenção e preparo dos resíduos vegetais	32
3.2 Reação de esterificação - Fração diclorometânica.....	33
3.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	33
3.4 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS	34
3.5 Atividade antimicrobiana.....	34
<i>3.5.1 Cepas bacterianas</i>	<i>34</i>
<i>3.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....</i>	<i>36</i>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Material vegetal	37

4.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	37
4.2.1 Extrato hexânico	37
4.2.2 Extrato diclorometânico	42
4.3 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS	45
4.3.1 Análise do extrato diclorometânico	45
4.3.2 Análise dos extratos polares	47
4.4 Atividade antimicrobiana	57
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Utilização de produtos naturais

Desde a antiguidade os produtos naturais são utilizados pelo ser humano. Acredita-se que a aplicação de plantas para o tratamento, prevenção e cura de doenças tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental está repleta de exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, destacando-se as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006). A química orgânica se desenvolveu simultaneamente ao estudo de plantas, resultando no isolamento de substâncias bioativas como a morfina, quinina, e a cânfora que ainda são utilizadas no tratamento de algumas enfermidades (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

O impacto dos produtos naturais no tratamento de uma ampla gama de doenças é bastante conhecido. A diversidade química dos metabólitos secundários produzidos na natureza é impressionante. Com o benefício de milhões de anos de evolução, plantas e microrganismos conseguiram montar uma série de estruturas estereoquimicamente complexas que lhes proporcionam uma vantagem competitiva nos ecossistemas que habitam. Além disso, a biossíntese dessas moléculas é influenciada por fatores bióticos e abióticos (DECORTE, 2016).

A extensa aplicação e diversidade de metabólitos secundários despertam o interesse de pesquisadores que visam as plantas como fonte promissora de novas substâncias ativas. As indústrias agronômicas, alimentícias e farmacêuticas possuem grande interesse na descoberta desses compostos, pois possuem elevada importância comercial (ARRAIS, 2012).

1.2 Família Anacardiaceae

A maioria dos membros das Anacardiaceae são árvores ou arbustos localizados principalmente em áreas tropicais, mas também em áreas subtropicais e temperadas. Compreendem aproximadamente 70 gêneros e 600 espécies de árvores ou arbustos conhecidas pela sua importância como frutíferas, como manga (*Mangifera indica* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), seriguela (*Spondias mombin* L.), pistache (*Pistacia vera* L.) e aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolia* Raddi) (DUARTE, TOLEDO, OLIVEIRA, 2006; SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN e SCHIEBER, 2015).

Os gêneros mais estudados quimicamente são: *Anacardium*, *Lannea*, *Lithraea*, *Mangifera*, *Melanorrhoea*, *Pistacia*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Schinus*, *Semecarpus*, *Spondias* e *Tapirira*. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas, lipídios fenólicos e derivados (CORREIA et al., 2006; SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN e SCHIEBER, 2015).

1.3 Espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi

Pertencente à família Anacardiaceae a espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi, também relatada como *Schinus terebinthifolius* Raddi (Figura 1) é conhecida popularmente como aroeira, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, aroeira-da-praia, aroeira-mansa, aroeira-do-campo, aroeira-do-sertão entre outros (LORENZI, 2002). Nos Estados Unidos é considerada uma planta invasora e é conhecida como Brazilian peppertree, christmas berry e pink pepper (MORTON, 1978; GEIGER et al. 2011). Possui distribuição tropical e subtropical ocorrendo de forma natural no Uruguai, Paraguai, leste da Argentina e no Brasil, estendendo-se desde Rio Grande do Norte até Rio Grande do Sul. Pode ser encontrada em Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (Nordeste), Mato Grosso do Sul (Centro-oeste), Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Sudeste), Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Sul) (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; SILVA-LUZ e PIRANI, 2015).



Figura 1. *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Essa espécie atinge de 5-10 m de altura e 20-30 cm de diâmetro quando jovem. Os indivíduos adultos chegam a alcançar 15 m de altura e 60 cm de diâmetro. Pode ser encontrada na forma de arbusto retorcido ou em forma de árvore. Suas folhas são perenes, verde-escuras, apresentam 10-15 cm de comprimento por 2-3 cm de largura, suas flores são pequenas e apresentam coloração de amarelo a branco. Seus frutos são numerosos, pequenos, em forma de drupa, quando imaturos são verde-claros, e quando maduros, apresentam cor vermelha (DUARTE et al., 2006; NEVES et al., 2016).



Figura 2. Distribuição geográfica de *Schinus terebinthifolia* Raddi no Brasil (Adaptado de Silva-Luz e Pirani, 2015).

O principal produto obtido pelo cultivo da aroeira são seus frutos, conhecidos como pimenta rosa. No Brasil grande parte da produção de pimenta rosa tem origem na exploração extrativista, principalmente no Espírito Santo e no Rio de Janeiro. Atualmente alguns produtores do Espírito Santo vêm cultivando a aroeira para produção de frutos devido aos elevados preços alcançados no mercado. Apesar desses plantios não apresentarem um sistema de produção definido, já existe um trabalho inicial para a seleção de matrizes voltada à produção de frutos (NEVES et al., 2016).

O Espírito Santo é o estado brasileiro onde mais se extrai aroeira para a indústria. Como seu cultivo tem se mostrado como uma boa alternativa de renda, muitas famílias de comunidades rurais, incentivadas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), estão passando do extrativismo para o cultivo de aroeira (INCAPER, 2016). Desde 2012 o município de São Mateus é o maior produtor e exportador de pimenta rosa do mundo, tendo como maior concorrente os produtores das Ilhas Maurício, na Ásia (SILVA, 2017). A aparência agradável e o sabor suave levemente picante garantem à pimenta rosa um lugar entre as especiarias utilizadas para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária em todo mundo (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e PRADO, 2005), mas também a procura por substâncias quimiopreventivas, como flavonoides e outros compostos fenólicos, justifica sua utilização como alimento, agregando valor ao produto agrícola (RUAS, 2016).

Além de possuir espaço no mercado de condimentos, a *S. terebinthifolia* também está presente nas indústrias farmacêutica e cosmética que têm pesquisado e desenvolvido produtos a partir dessa planta, como o creme antissinais da linha Chronos da Natura® (Figura 3) preparado a partir de folhas e dois produtos do laboratório farmacêutico Hebron®, preparados a partir do extrato seco da casca, um medicamento fitoterápico indicado no tratamento sintomático da gastrite leve a moderada, (Kios®) e um sabonete íntimo (Kronel®) (Figura 4).



AQUA, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, CYCLOPENTASILOXANE, GLYCERIN, POLYMETHYLSILSESQUIOXANE, HOMOSALATE, CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE, BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, DIETHYLAMINO HYDROXYBENZOYL HEXYL BENZOATE, ISOAMYL COCOATE, C12-15 ALKYL BENZOATE, GLYCERYL STEARATE CITRATE, CAPRYLYL METHICONE, ETHYLHEXYL TRIAZONE, PHENOXYETHANOL, HYDROXYETHYL ACRYLATE/SODIUM ACRYLOYLDIMETHYL TAURATE COPOLYMER, METHYLENE BIS-BENZOTRIAZOLYL TETRAMETHYLBUTYLPHENOL, SQUALANE, POTASSIUM CETYL PHOSPHATE, ASTROCARYUM MURUMURU SEED BUTTER, TRIETHANOLAMINE, ACRYLATES/C10-30 ALKYL ACRYLATE CROSSPOLYMER, XANTHAN GUM, TOCOPHERYL ACETATE, PARFUM, POLYSORBATE 60, DECYL GLUCOSIDE, BHT, DISODIUM EDTA, PAEONIA ALBIFLORA ROOT EXTRACT, PEG-4 LAURATE, PEG-4 DILAURATE, CASEARIA SYLVESTRIS LEAF EXTRACT, SORBITAN ISOSTEARATE, SILICA, **SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS LEAF EXTRACT**, THEOBROMA CACAO SEED EXTRACT, PEG-200, IODOPROPYNYL BUTYLCARBAMATE, CAMELLIA SINENSIS LEAF EXTRACT, CAPRYLYL GLYCOL, PROPYLENE GLYCOL, ETHYLHEXYLGLYCERIN, CONOBEA SCOPARIOIDES LEAF OIL, ACETYL TETRAPEPTIDE-2, MALTODEXTRIN, 1,2-HEXANEDIOL, DMDM HYDANTOIN, POTASSIUM SORBATE, CITRONELLOL, BUTYLPHENYL METHYLPROPIONAL, ALPHA-ISOMETHYL IONONE.

Figura 3. Composição química de Creme Antissinais da linha Chronos Natura®.

Fonte: <http://rede.natura.net/espaco/creme-antissinais-60-preenchimento-e-revitalizacao-chronos-40g-57985#detalhe-ingredientes>



Figura 4. Medicamento fitoterápico e sabonete íntimo que contém *S. terebinthifolia*.

Fonte: http://www.hebron.com.br/produto/produto_aberto/gastro/31

1.4 Potencial biológico e principais metabólitos secundários encontrados em *S. terebinthifolia* Raddi

Na medicina popular, a aroeira tem sido utilizada no tratamento de problemas respiratórios, úlceras, doenças de pele, feridas, reumatismo, diarreia, artrite, como antisséptico e anti-inflamatório (SANTANA et al., 2012) e possui diferentes atividades biológicas descritas na literatura, como ação antialérgica (CAVALHER-MACHADO et al., 2008), anti-inflamatória (ROSAS et al., 2015; DA SILVA M. M. et al., 2017) e antimicrobiana (GOMES et al., 2013; MUHS et al., 2017; DA SILVA J.H.S. et al., 2017).

As propriedades desta planta foram relatadas desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira devido à sua importância e ao vasto conhecimento de suas aplicações biológicas (CARVALHO et al., 2013), além de estar presente no Formulário Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (2011) (ANVISA, 2011) e na lista de fitoterápicos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Lima et al. (2009) verificaram que a administração oral do extrato seco da casca de *S. terebinthifolia* em ratos Wistar não induziu quaisquer efeitos tóxicos, o que poderia constituir uma garantia para o uso medicinal desta planta.

Estudos fitoquímicos identificaram presença de fenóis, triterpenos pentacíclicos e antraquinonas no extrato etanólico da casca do caule de *S. terebinthifolia*. O extrato etanólico das folhas foi positivo para fenóis, flavonas, flavonoides, xantonas e leucoantocianidinas, flavanonas e esteroides livres (LIMA et al., 2006).

O extrato das folhas *S. terebinthifolia* apresentou atividade antialérgica (CAVALHER-MACHADO et al., 2008), anti-inflamatória (ROSAS et al., 2015) e efeito larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* (PRATTI, et al., 2015; PROCÓPIO et al., 2015). Gomes et al. (2013) constataram que a lectina isolada das folhas mostrou forte atividade antimicrobiana com propriedades bactericidas e fungicidas. O extrato etanólico das folhas contendo ácido ferúlico, quercetina e ácido cafeico apresentou atividade antioxidante e ação antimicrobiana contra as principais bactérias causadoras de infecção do trato urinário (ULIANA et al., 2016).

Estudando a partição em acetato de etila proveniente do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolia*, Ceruks et al. (2007) isolaram e identificaram cinco compostos que podem estar relacionados com atividade anti-radical livre, os galatos de metila e etila, e os flavonoides miricetrina, quercitrina e miricetina. Além dessas substâncias, Santana et al. (2012) também isolaram ácido gálico e os flavonoides *trans*-catequina e afzelina. Nesse estudo o ácido gálico e o galato de etila apresentaram potencial contra células de leucemia e carcinoma humano.

Guerra et al. (2000) observaram que o extrato etanólico das folhas apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas auruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os galotaninos pentagalatoglucose e

galato de metila e quatro flavonoides: robustaflavona, quercetina, quercitrina e luteolina foram isolados no extrato bruto das folhas de *S. terebinthifolia* e exibiram atividade antioxidante e seletividade para células de câncer de ovário. O galato de metila também apresentou atividade anti-inflamatória (DA SILVA M. M. et al., 2017).

As Figuras 5 e 6 apresentam alguns dos principais compostos fenólicos encontrados em *Schinus terebinthifolia* Raddi.

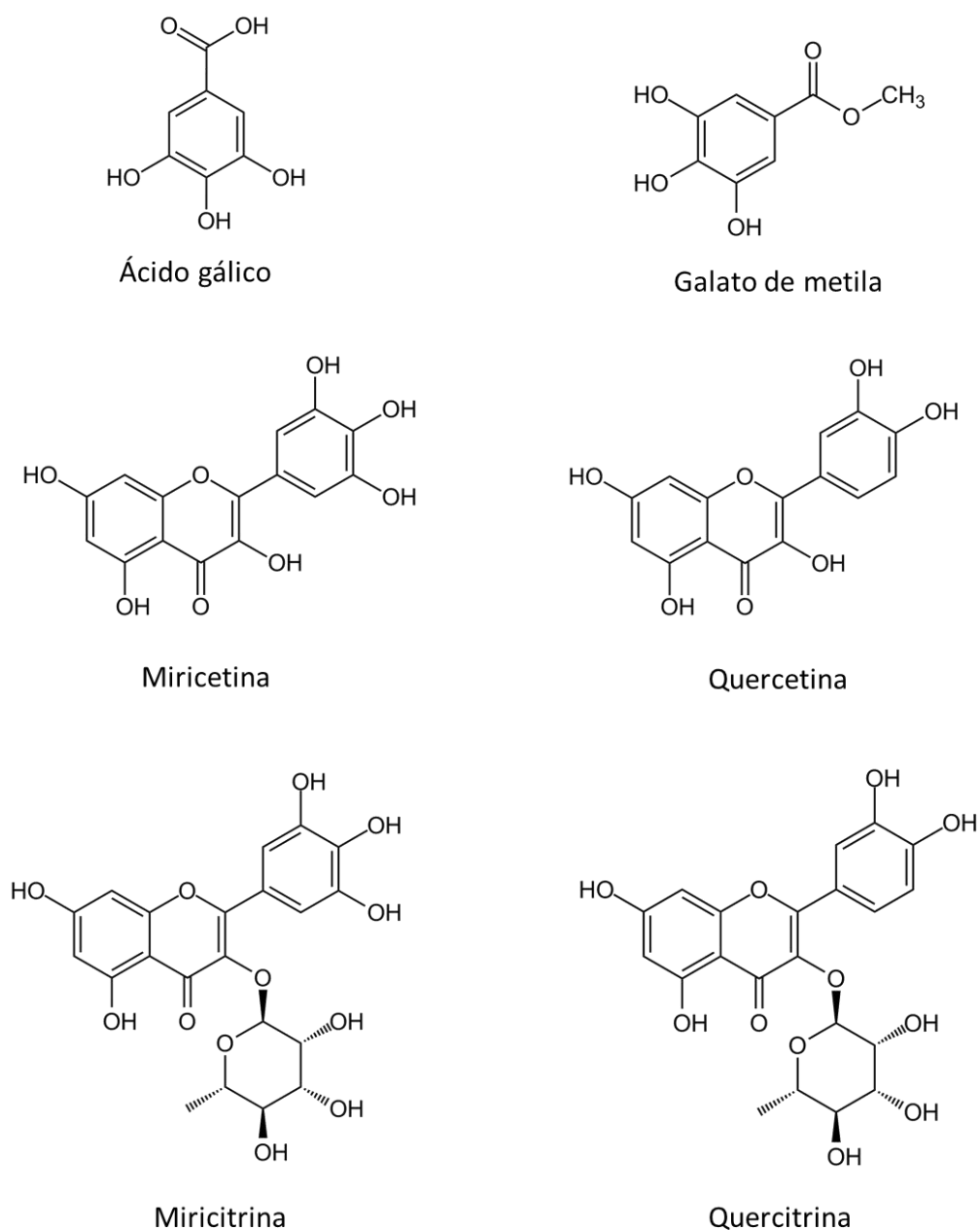


Figura 5. Estruturas dos principais compostos fenólicos encontrados em *S. terebinthifolia*.

Nos frutos foram identificados antocianinas, ácido gálico, compostos de galoilglicose, ácidos galoilchiquímicos e os biflavonoides agatisflavona, robustaflavona amentoflavona, tetraidroamentoflavona e tetraidrrobustaflavona (FEUEREISEN et al., 2014, 2017; MUHS et al., 2017).

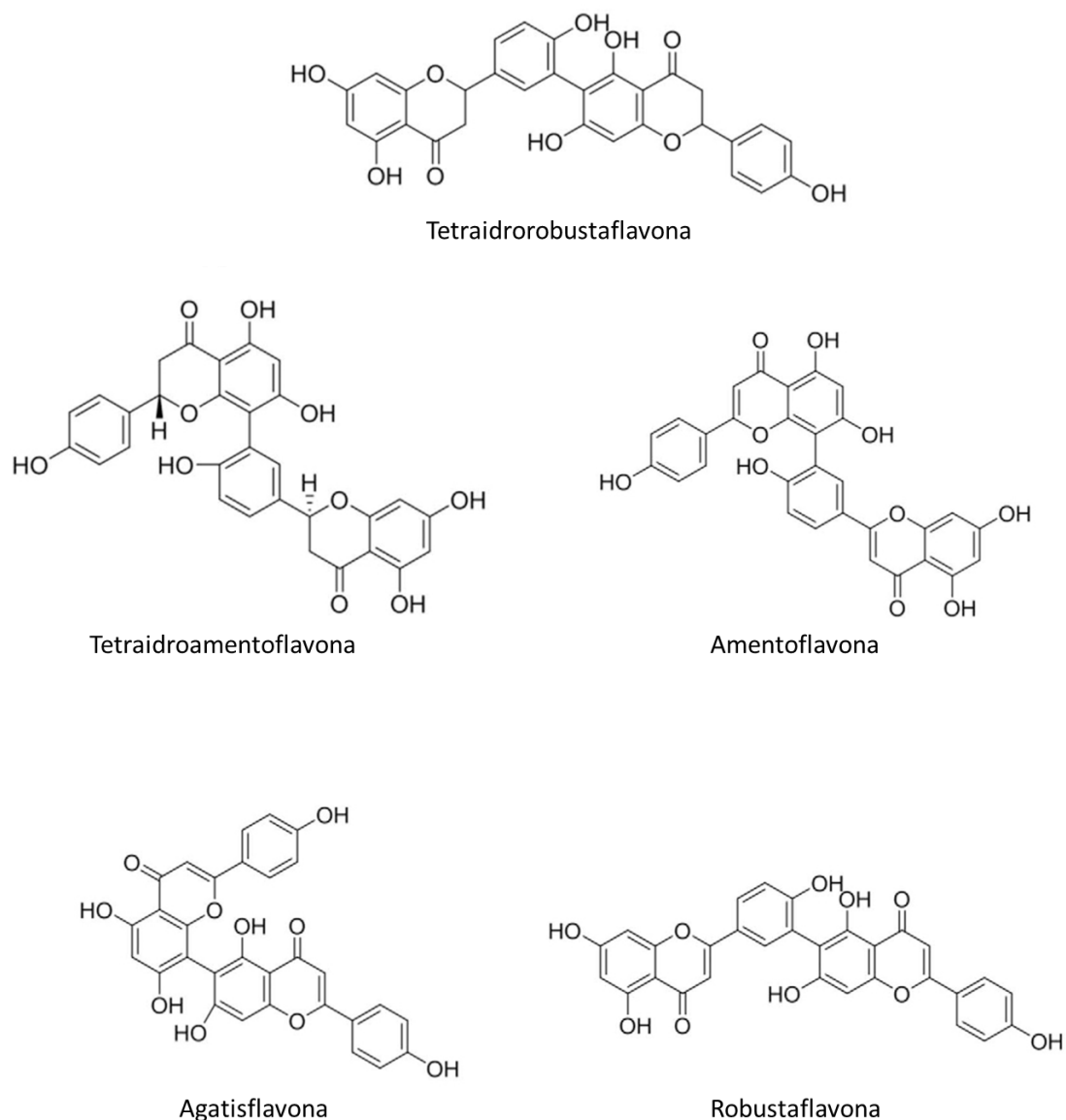


Figura 6. Estruturas dos biflavonoides identificados em *S. terebinthifolia*.

Santana et al. (2012) descrevem a produção de ácidos graxos e terpenos pela espécie, principalmente o schinol e o ácido masticadienoico (Figura 7). Estudos confirmam a presença de ácidos graxos, monoterpenos e sesquiterpenos. Os óleos essenciais apresentam atividade antibacteriana contra as bactérias *E. feacium* e *S. agalactiae* e inseticida contra os insetos *Spodoptera littoralis* e *Phthorimaea operculella* (ENNIGROU et al., 2017, 2018). O óleo essencial rico em β -terpineol e β -cariofileno foi ativo contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (EL-MASSRY et al. 2009). Outros terpenos também foram identificados, α -felandreno, β -felandreno, α -terpineol, α -pineno, β -pineno, *p*-cimeno e γ -cadineno, como principais constituintes em óleos essenciais que apresentaram atividade contra células de câncer de mama (BENDAOU et al., 2010). Elshafi et al. (2016) constataram as atividades antifúngica e antibacteriana do óleo essencial rico em α -pineno, α -felandreno e limoneno.

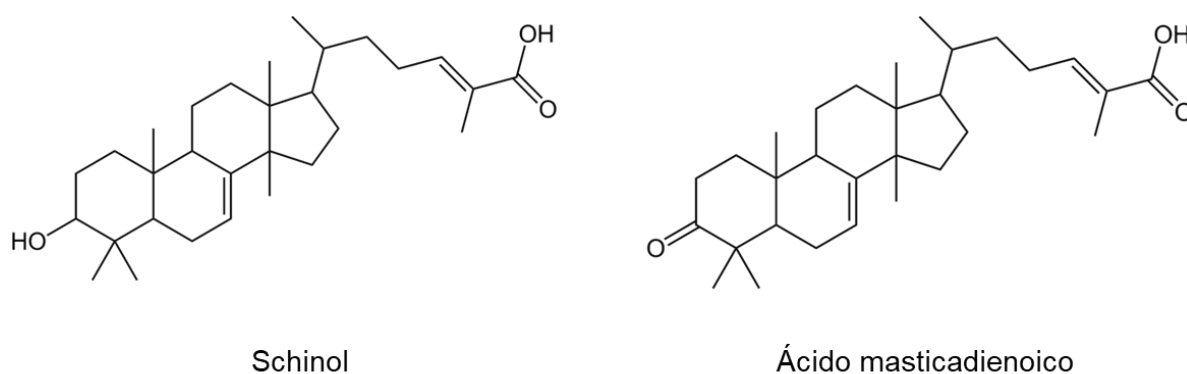


Figura 7. Ácido masticadienoico e schinol.

1.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A CG-EM fornece informações qualitativas e, eventualmente, quantitativas sobre os compostos presentes em uma mistura química complexa. A coluna cromatográfica separa as substâncias resultando em diversos tempos de retenção. Após o término do ciclo cromatográfico, os compostos são analisados pelo espectrômetro de massas e identificados pelos seus espectros (GUFFANTI et al., 2018). É um método altamente adequado para a análise de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis, que constituem um dos grupos mais diversificados de metabólitos produzidos por plantas e microrganismos (DE SOUZA et al., 2018). Para a análise de substâncias polares, é necessário que elas sejam derivatizadas para torná-las voláteis, possibilitando a separação por CG (ALSEEKH e FERNIE, 2018).

Essa técnica é amplamente utilizada, pois combina a separação eficiente da cromatografia gasosa, juntamente com as informações espectrais e sensibilidade satisfatória proporcionadas pela espectrometria de massas (HERNÁNDEZ et al., 2011). O efluente da cromatografia gasosa é introduzido no sistema de vácuo do espectrômetro de massa e os analitos são tradicionalmente ionizados em um sistema de vácuo antes da detecção pelo espectrômetro de massas. A ionização por impacto de elétrons (EI) é a técnica de ionização mais adotada devido à sua capacidade de ionizar uma ampla gama de compostos orgânicos e disponibilidade para pesquisar em uma biblioteca espectral (LI et al., 2015), além de resultar em padrões de fragmentação altamente reprodutíveis que são essenciais para experimentos em grande escala. A CG-EM apresenta-se como uma técnica relativamente sensível e altamente robusta, o que significa que é possível medir rotineiramente centenas de analitos em um elevado número de amostras. (ALSEEKH e FERNIE, 2018).

1.6 Espectrometria de massas

Na espectrometria de massas as substâncias são ionizadas e os íons são separados de acordo com sua relação massa carga (m/z) e detectados proporcionalmente à sua abundância. Os espectrômetros de massas são constituídos basicamente por um sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas e detector. As fontes de ionização podem variar dependendo dos compostos a serem analisados. Alguns exemplos são: ionização por impacto de elétrons (EI), ionização química (CI), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), fotoionização à pressão atmosférica (APPI) e ionização por eletrospray (ESI). Assim como as fontes de ionização, também existem diferentes analisadores de massas como: setor magnético, quadrupolo, aprisionamento de íons (IT), tempo de voo (TOF) e ressonância ciclotrônica de íons (ICR) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

1.6.1 ESI FT-ICR MS (Electrospray Ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry)

Na ionização por eletrospray os íons são emitidos diretamente de gotículas carregadas para a fase gasosa por processos de evaporação iônica, sem degradação térmica da amostra. É importante que ocorra a formação de gotículas estáveis e finas para a obtenção de um forte sinal de analito (LI et al., 2015). A amostra é solubilizada em um solvente volátil, em meio ácido ou básico, de forma a causar a protonação ou desprotonação das moléculas (ROMÃO, 2010). Esse processo depende das características das moléculas a serem analisadas. Por exemplo, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas no modo negativo (CROTTI et al., 2006). A mistura contendo a amostra e o solvente é conduzida por um capilar metálico submetido a um potencial elétrico que promove a migração de cargas para a interface capilar/solução, formando uma dupla camada elétrica. As gotas carregadas sofrem ação do gás nebulizador e tornam-se cada vez menores pela evaporação do solvente. Esse processo aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas em suas superfícies até o ponto em que ocorre um fenômeno chamado de “explosão coulômbica”. Como resultado, são formadas gotas menores com posterior

liberação dos íons $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$. Os íons também podem ser observados na forma de adutos, onde são coordenados por cátions ou ânions: $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ ou $[M+Cl]^-$ (CROTTI et al., 2006, ROMÃO, 2010).

No analisador ICR a separação se baseia na medida de diferentes frequências de ciclotron desenvolvidas pelos íons quando submetidos a um campo magnético (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Os analisadores FT-ICR MS fornecem a resolução e precisão de massa necessárias para atribuir confiavelmente fórmulas moleculares aos íons detectados e têm sido utilizados para a caracterização de metabólitos desconhecidos pela atribuição inequívoca de fórmulas elementares. Essas características são ideais para análise de misturas complexas encontradas em aplicações de metabolômica de alto rendimento (GHASTE, MISTRIK e SHULAEV, 2016).

1.7 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial e diversas iniciativas de controle têm sido propostas. Assim, a contínua emergência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde constitui-se um grande desafio que mobiliza órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos (OLIVEIRA e SILVA, 2008).

Em países ricos, o uso inadequado de antibióticos está relacionado com a prescrição excessiva desses medicamentos. Isso ocorre devido à incerteza diagnóstica, especialmente quando o quadro clínico da etiologia viral ou bacteriana é semelhante. A automedicação também desempenha um papel importante. Em muitos países em desenvolvimento, o acesso facilitado aos medicamentos antimicrobianos (aquisição sem receita médica) contribui para uso inadequado. No ambiente hospitalar, seu uso intensivo e prolongado é provavelmente o principal contribuinte para o surgimento e disseminação de infecções resistentes a antibióticos. Além disso, o uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos e na aquicultura também favorece o aparecimento de microrganismos resistentes (PRESTINACI, PEZZOTTI e PANTOSTI, 2015).

Esforços de saúde pública têm tentado conter o surgimento de resistência, reduzindo antibióticos desnecessários e interrompendo a adição de antibióticos subterapêuticos na alimentação dos animais. No entanto, tais políticas exigem que a adoção global seja realmente efetiva, o que ainda não foi possível (NICHOL et al., 2015). O combate ao desenvolvimento e propagação de bactérias resistentes aos antibióticos requer uma abordagem conjunta de vários segmentos governamentais e da sociedade, além de políticas que resultem em um amplo investimento em pesquisas, na aquisição de tecnologias e no desenvolvimento de recursos humanos (ANVISA, 2017).

A resistência a antibióticos é um fenômeno natural que ocorre quando microrganismos são expostos a agentes antimicrobianos. Sob a pressão seletiva dos antibióticos, as bactérias suscetíveis são mortas ou inibidas, enquanto as bactérias que são naturalmente (ou intrinsecamente) resistentes ou que adquiriram características resistentes aos antibióticos têm uma chance maior de sobreviver e se multiplicar (PRESTINACI, PEZZOTTI e PANTOSTI, 2015). Os mecanismos de resistência antibacteriana podem ser divididos em duas categorias: (a) resistência inata ou intrínseca que é principalmente uma característica de uma determinada bactéria e é baseada nas suas propriedades biológicas. (b) resistência adquirida que está relacionada com a aquisição de genes de resistência por outras bactérias patogênicas ou mutação cromossômica e combinação desses dois mecanismos (FARHADI et al., 2018). O uso excessivo e inadequado de antibióticos (escolhas e dosagem inadequadas e baixa adesão às diretrizes de tratamento) contribuem para o aumento desse fenômeno preocupante e que ameaça a saúde pública mundial (PRESTINACI, PEZZOTTI e PANTOSTI, 2015).

Em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista de agentes patogênicos prioritários resistentes aos antibióticos contendo bactérias que ameaçam a saúde humana. Entre eles estão *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE) e os bacilos Gram-negativos não fermentadores produtores de carbapenemase: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (WHO, 2017a).

As bactérias que pertencem ao gênero *Enterococcus* estão associadas a diversos tipos de infecções como as pélvicas, neonatais, do trato urinário e endocardites infecciosas. Sua capacidade de resistir aos antimicrobianos, de adquirir e disseminar determinantes de resistência a antibióticos e a plasticidade do seu genoma tornam essas bactérias importantes patógenos humanos. As espécies de *Enterococcus* mais isoladas em casos de infecção humana são: *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (MURRAY, 1990, 2000; CATTOR e LECLERCQ, 2013).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que pode fazer parte da microbiota normal da pele e do nariz, mas é um dos mais importantes patógenos humanos. Podem causar várias infecções, principalmente na pele, tecidos moles, ossos e corrente sanguínea. É também a causa mais comum de infecções de feridas pós-operatórias (WHO, 2017b). As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são a causa mais comum de infecções resistentes aos antibióticos adquiridas pela comunidade (TONIAL et al., 2016). Apesar do vasto conhecimento sobre esse patógeno, ainda é muito difícil erradicá-lo ou prevenir as infecções graves causadas por ele, pois possui mecanismos de virulência e quorum sensing que lhe permite causar infecções graves. Sua diversidade genética e capacidade de adquirir novos genes exógenos permitem que ele se adapte a diferentes condições ambientais e module sua patogenicidade. Esse microrganismo também demonstrou facilidade para adquirir resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (MOELLERING, 2012).

Além dessas espécies, a *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* também são importantes patógenos que causam uma ampla gama de infecções graves em pacientes internados e em unidade de terapia intensiva (UTI). Geralmente são multirresistentes (MDR) e têm apresentado crescente resistência às oximinocefalosporinas e carbapenêmicos nos últimos vinte anos. A resistência à carbapenema é considerada um significativo problema de saúde, pois existem poucas opções de tratamento (RAHMAN et al., 2018).

Geralmente as infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos estão associadas ao excesso de mortalidade, internação prolongada e aumento de custos hospitalares (COSGROVE, 2006; DE KRAKER et al., 2011). Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre novos agentes ativos contra esses microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente os resíduos provenientes da indústria de beneficiamento de pimenta rosa por métodos cromatográficos e espectrométricos, bem como avaliar a atividade de seus extratos contra as principais espécies bacterianas isoladas em hospitais.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as substâncias voláteis e volatilizáveis por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);
- Identificar por ESI(-)FT-ICR MS os principais compostos fenólicos presentes nos extratos polares;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos contra espécies bacterianas multirresistentes presentes na lista da Organização Mundial da Saúde de agentes patogênicos prioritários para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção e preparo dos resíduos vegetais

Os resíduos foram coletados em uma indústria localizada no município de Boa Esperança – ES, que recebe frutos produzidos no Sul e no Norte do Espírito Santo com cultivo orientado pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Esse material é formado basicamente por folhas e cascas de frutos não aproveitados. Os extratos foram preparados submetendo-se a amostra (50 g) à extração com os solventes orgânicos hexano (3 x 130 mL), diclorometano (3 x 130 mL) e metanol (3 x 130 mL), sucessivamente. A cada extração, o solvente permaneceu em contato com a amostra durante 24 h à temperatura ambiente. Da mesma forma, uma nova quantidade de amostra (50 g) foi submetida à extração, mas utilizando uma solução hidroetanólica 54% v/v como solvente extrator. As cascas dos frutos que são descartadas no processo de beneficiamento também foram utilizadas para o preparo de extrato. Elas foram pesadas (50 g) e submetidas à percolação com uma solução hidroetanólica (54% v/v) (3 x 130 mL) à temperatura ambiente (Figura 8). Depois de preparados, todos os extratos foram secos em rotaevaporador.

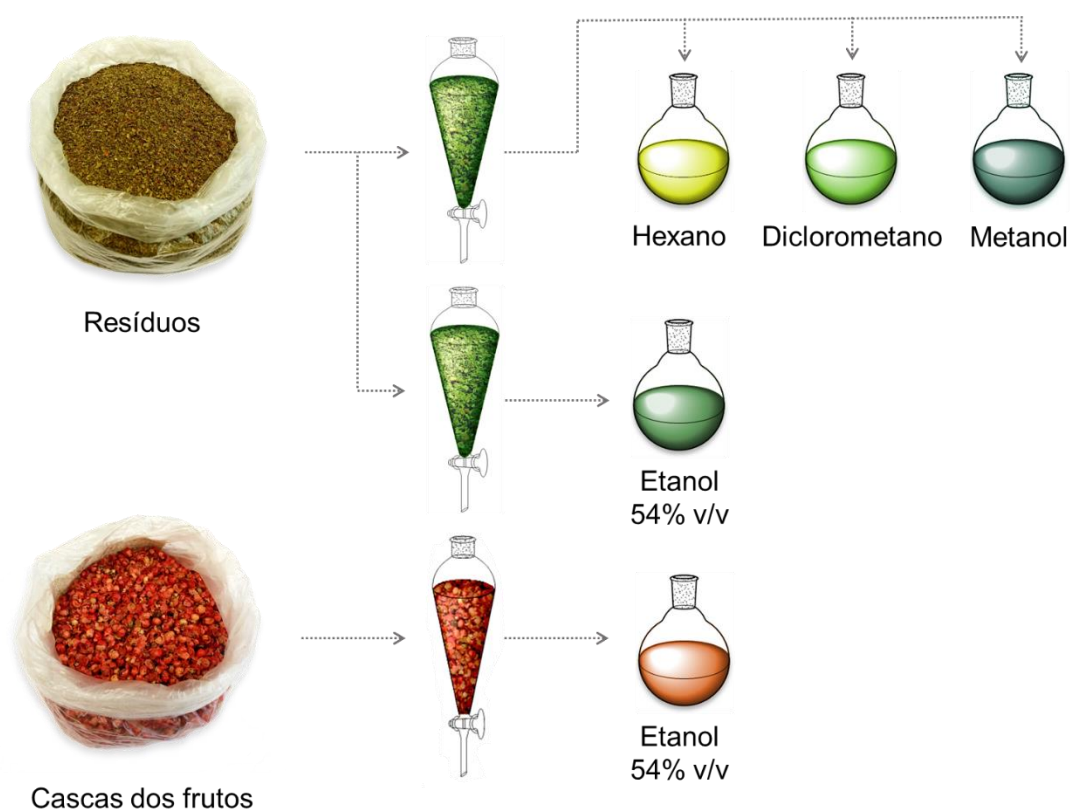


Figura 8. Preparo dos extratos dos resíduos e das cascas dos frutos.

3.2 Reação de esterificação - Fração diclorometânica

O extrato diclorometânico (0,8 g) foi colocado sob refluxo com 10 mL de solução de KOH 0,5 mol.L⁻¹ por 10 min. Em seguida, o meio foi resfriado e 5 mL de uma solução metanólica de BF₃ foram adicionados e o meio foi colocado sob refluxo por mais 10 min. Após resfriamento, o conteúdo foi transferido para um funil de separação e submetido à extração com hexano e uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi coletada, filtrada e o solvente evaporado obtendo-se a fração diclorometânica esterificada.

3.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As frações hexânica e diclorometânica foram analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). A separação e identificação das substâncias foi realizada em um equipamento da marca Agilent 19091S-433 UI, HP-5MS Ultra Inert equipado com uma coluna HP-5MS de 30 m x 250 µm x 0,25 µm. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, permanecendo por 1 minuto. Foi utilizada uma taxa de aquecimento de 5 °C/minuto até 240 °C, aumentada para 310 °C a 30 °C/min e mantida por 20 min. O tempo total de análise foi de 63 minutos. As amostras foram diluídas em hexano (5,8 mg/mL) e diclorometano (10 mg/mL) e o volume injetado foi de 1,0 µL com o injetor no modo split 1:10.

Uma série de *n*-alcanos foi analisada nas mesmas condições cromatográficas possibilitando o cálculo dos índices de retenção dos compostos. Os principais constituintes químicos das amostras foram propostos pela comparação dos espectros de massa com a base de dados da biblioteca NIST, posteriormente comparando-se os índices de retenção com a literatura (ADAMS 2009, THE PHEROBASE-DATABASE, 2018, CHEMISTRY WEBBOOK, 2018).

3.4 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS

As frações metanólica, hidroetanólicas e diclorometânica foram analisadas por Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS) para determinação do perfil químico.

As amostras foram analisadas na concentração de 1 mg/mL em uma solução de acetonitrila:água (1:1) que foi infundida na fonte eletrospray (ESI), a uma taxa de 5 µL/min. Os espectros foram obtidos no modo negativo em uma faixa de massa m/z 150-1500. Entre as condições da fonte ESI utilizadas nas análises estão a pressão do gás nebulizador de 1,0 Bar, a tensão capilar de 3,8 kV e a temperatura de transferência capilar de 200 °C. Além disso, o tempo de acumulação dos íons foi de 0,010 s e cada espectro foi adquirido pela acumulação de 32 scans. Os espectros foram obtidos com alta resolução fornecendo fórmulas moleculares inequívocas para íons moleculares de carga única. Para os experimentos de MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 1 Da proporcionando o isolamento do íon de interesse.

Os espectros de massa foram adquiridos e processados utilizando o software Compass Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.5 Atividade antimicrobiana

3.5.1 Cepas bacterianas

As cepas foram selecionadas junto ao Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana e ao RESBAC (Laboratório de Resistência Bacteriana) da Universidade Federal do Espírito Santo. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra 15 cepas bacterianas isoladas de diferentes hospitais do Espírito Santo: 5 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), 5 cepas de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) (2 cepas de *Enterococcus faecium* e 3 cepas de *Enterococcus faecalis*), 5 cepas de bacilos Gram-negativos não fermentadores produtores de carbapenemase (2 cepas de *Acinetobacter baumannii* e 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*). Foram também avaliadas as seguintes cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* (ATCC 29213),

E. faecalis (ATCC 29212), *A. baumannii* (ATCC 19606) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). As Tabelas 1 e 2 apresentam informações sobre o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas clínicas.

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 15 cepas clínicas utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana.

Espécies	Cepas	Resistência*
<i>S. aureus</i>	10A	ERI; OXA; CEF; PEN; CIP; GEN; NOR
	23A	ERI; CLI; OXA; CEF; PEN; RIF; CIP; NOR
	35A	ERI; CLI; OXA; CEF; PEN; CIP; NOR
	67A	ERI; CLI; OXA; CEF; PEN; RIF; CLO; CIP; NOR
	114A	OXA; CEF; PEN; CIP; NOR
<i>E. faecium</i>	70E	AMP; ERI; EST HL; PEN; VAN; NOR; CIP; NIT; TET; TEC
	101E	AMP; ERI; EST HL; PEN; VAN; NOR; CIP; NIT; TEC
<i>E. faecalis</i>	1277	VAN
	6885	VAN
	168557	VAN
<i>A. baumannii</i>	30B	IPM; MER; GEN; TOB; AMI; CIP; LEV; SUT
	101B	IPM; MER; GEN; TOB; AMI; CIP; LEV; SUT
<i>P. aeruginosa</i>	34B	CAZ; CPM; MER; IPM; TAC
	39B	CIP; GEN; MER; AMI; TOB; LEV; IPM; TAC
	121B	CAZ; CIP; CPM; PIT; GEN; MER; AMI; TOB; LEV; IPM; TAC

*Dados obtidos junto ao Laboratório de Resistência Bacteriana da UFES.

Tabela 2. Lista de antimicrobianos testados para confirmação fenotípica do perfil de susceptibilidade.

Resistência	Antimicrobiano	Resistência	Antimicrobiano	Resistência	Antimicrobiano
AMI	Amicacina	EST HL	Estreptomicina	PIT	Piperacilina + Tazobactam
AMP	Ampicilina	GEN	Gentamicina	RIF	Rifampicina
CAZ	Ceftazidima	IPM	Imipenem	SUT	Sulfametoxazol + Trimetoprima
CEF	Cefalotina	LEV	Levofloxacina	TAC	Ticarciclina + Clavulanato
CIP	Ciprofloxacina	MER	Meropenem	TEC	Teicoplanina
CLI	Clindamicina	NIT	Nitrofurantoína	TET	Tetraciclina
CLO	Cloranfenicol	NOR	Norfloxacina	TOB	Tobramicina
CPM	Cefepime	OXA	Oxacilina	VAN	Vancomicina
ERI	Eritromicina	PEN	Penicilina		

3.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A CIM e a CBM foram determinadas pelo método de microdiluição de acordo com a metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) utilizando caldo Mueller-Hinton (MHb) como meio de cultura e dimetilsulfóxido (DMSO) como emulsificante. As cepas bacterianas das culturas crescidas em meio sólido não seletivo por 20-24 h de incubação a 37 °C foram suspensas em solução salina a 0,85% e ajustadas para o padrão de 0,5 da escala de Mc Farland. Na microplaca com 96 poços, cada poço foi preenchido com 180 µL de solução de cada extrato em concentrações entre 0,30 e 2,70 mg/mL e 20 µL de suspensão bacteriana. Os resultados foram baseados no crescimento visual das bactérias após 24 h de incubação a 37 °C e confirmados com a adição de 20 µL de solução de resazurina (0,015% m/v) após mais 3 h de incubação a 37 °C. A CIM foi definida como a concentração mínima de extrato capaz de inibir o crescimento visível das células. 5 µL de solução de cada poço, onde não foi observado o crescimento foram aplicados em placas contendo ágar nutriente. As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas. A CBM foi considerada a menor concentração onde o crescimento bacteriano não foi observado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material vegetal

Após eluição das amostras foram obtidos os extratos conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Extratos dos resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa.

Extrato	Massa de amostra (g)	Massa de extrato obtido (g)	Rendimento (%)
EM	50	11,47	22,94
ED		1,28	2,55
EH		2,20	4,39
Ehid		11,81	23,62
ECF		16,20	32,40

EM - Extrato metanólico; ED - Extrato diclorometânico; EH - Extrato hexânico; Ehid - Extrato hidroetanólico, ECF - Extrato hidroetanólico das cascas dos frutos.

Os extratos preparados com solventes polares apresentaram maiores rendimentos, com o extrato metanólico e hidroetanólico dos resíduos apresentando valores similares e o extrato hidroetanólico das cascas dos frutos obtendo o maior rendimento de extração. Scheid et al. (2018) também obtiveram um maior rendimento do extrato polar (metanol) das folhas seguido das frações hexânica e diclorometânica. Outros trabalhos relatam rendimentos de 13% (ROCHA et al., 2017), 24,31% (BARBIERI et al., 2014) e 26,67% (BRAGA et al., 2007) para os extratos metanólicos das folhas de *S. terebinthifolia*. Em relação aos frutos, Muhs et al. (2017) obtiveram o rendimento de 28,46% para o extrato metanólico.

4.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

4.2.1 Extrato hexânico

A amostra foi analisada gerando o perfil cromatográfico mostrado na Figura 9.

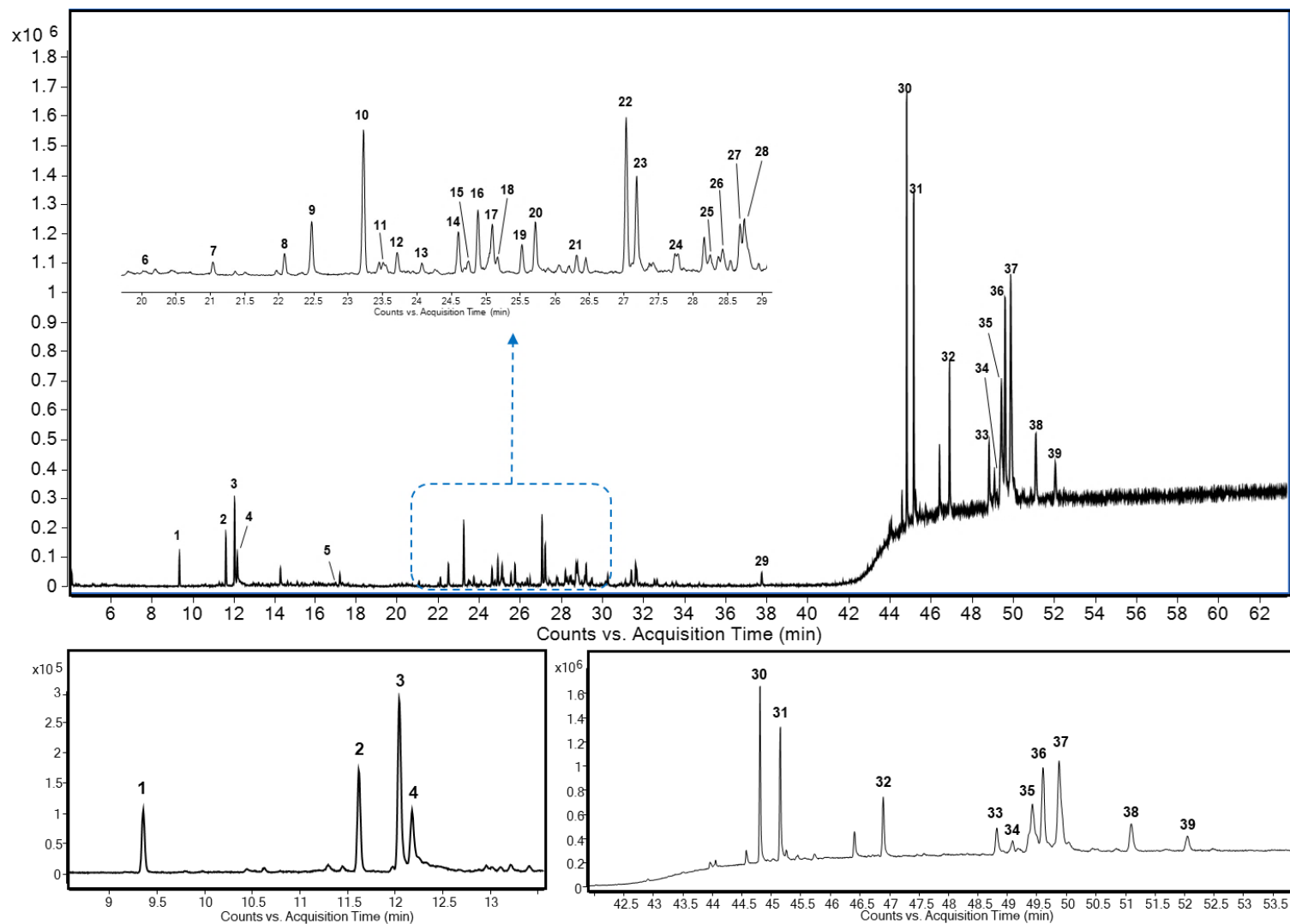


Figura 9. Cromatograma do extrato hexânico dos resíduos.

Foram identificadas 39 substâncias classificadas de acordo com as classes químicas: monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos/esteroides/outras, conforme apresentado na Tabela 4.

Os principais constituintes químicos das amostras foram propostos com base no índice de retenção, comparação dos espectros de massas obtidos com o banco de dados da biblioteca NIST, comparando-se os índices de retenção com a literatura e na descrição da substância na espécie, gênero ou família.

Os triterpenos pentacíclicos lupeol (16,32%), lupenona (12,75%) e 28-norolean-17-en-3-ona (10,69%) bem como seu precursor esqualeno (9,69%) estão entre os compostos majoritários sendo responsáveis por 49,45% da área total do cromatograma. O lupeol é um triterpeno encontrado em várias frutas e vegetais como azeitonas, manga e figo, e em muitas ervas medicinais (SALEEM et al., 2004). Essa substância também foi identificada no extrato hexânico de *Schinus molle* L. juntamente com a lupenona, sendo esta o principal componente (BATISTA et al., 2016). A literatura descreve a presença do triterpeno 28-norolean-17-en-3-ona em plantas do gênero *Pistacia*, que pertence à mesma família da *Schinus terebinthifolia* (Anacardiaceae) (STERN, et al., 2003; VUORINEN, A. et al., 2015), sendo um dos principais triterpenos encontrados em amostras de *Pistacia lentiscus* (ASSIMOPOULOU e PAPAGEORGIOU, 2005).

Sabe-se que diversos triterpenos naturais como o ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido betulínico, lupeol e outros possuem ação antitumoral (SALMINEN et al., 2008). O ácido ursólico e oleanólico apresentaram atividade antimicrobiana frente à *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* (JIMÉNEZ et al., 2005, 2013; KIM et al., 2012). Em um ensaio *in vivo* o lupeol interrompeu a angiogênese de um tumor e reduziu o crescimento de xenoinxertos de tumores de colangiocarcinoma (KANGSAMAKSIN et al., 2017).

Tabela 4. Composição química do extrato hexânico dos resíduos.

Nº	RT (min)	Substância Proposta	Área (%)	IR ^a
Monoterpenos				
1	9,359	α -pineno	0,96	928
2	11,621	3-careno	1,65	1004
3	12,047	<i>p</i> -cimeno	3,06	1018
4	12,182	limoneno	1,92	1023
5	16,976	α -terpineol	0,19	1185
6	20,022	timol	0,20	1295
Sesquiterpenos				
7	21,039	δ -elemeno	0,22	1333
8	22,076	α -copaeno	0,34	1373
9	22,466	β -elemeno	0,95	1388
10	23,218	β -cariofileno	2,08	1417
11	23,503	γ -elemeno	0,24	1429
12	23,706	aromadendreno	0,32	1437
13	24,064	humuleno	0,14	1452
14	24,593	γ -muuroleno	0,64	1473
15	24,743	germacreno D	0,23	1479
16	24,878	β -selineno	0,85	1484
17	25,086	α -selineno	1,07	1493
18	25,164	α -muuroleno	0,23	1496
19	25,517	γ -cadineno	0,39	1511
20	25,709	δ -cadineno	0,88	1519
21	26,310	elemol	0,23	1545
22	27,032	espatulenol	2,22	1576
23	27,187	óxido de cariofileno	1,66	1582
24	27,743	rosifoliol	0,50	1606
25	28,256	γ -eudesmol	0,32	1629
26	28,438	α -muurolol	0,42	1638
27	28,687	β -eudesmol	0,75	1649
28	28,754	α -eudesmol	1,36	1652
Triterpenos/Esteroides/Outros				
29	37,736	fitol	0,54	2102
30	44,803	esqualeno	9,69	2816
31	45,145	octacosano	8,20	2874
32	46,889	α -tocoferol	4,93	3136
33	48,814	β -sitosterol	3,63	3346
34	49,078	olean-12-en-3-ona	1,82	3373
35	49,416	28-norolean-17-en-3-ona	10,69	3405
36	49,592	lupenona	12,75	3417
37	49,867	lupeol	16,32	3437
38	51,097	acetato de lupeol	4,10	3524
39	52,041	acetado do aldeído ursônico	2,19	3592

^aÍndice de retenção obtido com referência a um padrão de *n*-alcanos utilizando uma coluna HP-5MS.

Como os resíduos são fragmentados e ficam expostos ao ambiente, esperava-se picos menores relacionados aos monoterpenos (7,98%) e sesquiterpenos (16,06%) devido à volatilização desses compostos. No entanto, foi possível identificar alguns terpenos produzidos por essa espécie como os monoterpenos *p*-cimeno (3,06%), limoneno (1,92%), 3-careno (1,65%), α -pineno (0,96%) e os sesquiterpenos espatulenol (2,22%), β -cariofileno (2,08%), óxido de cariofileno (1,66%) e o α -eudesmol (1,36%) (Figura 10). Essas substâncias são descritas como componentes do óleo essencial de *S. terebinthifolia* (LLOYD et al., 1977; BENDAOUD et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; ENNIGROU et al., 2017).

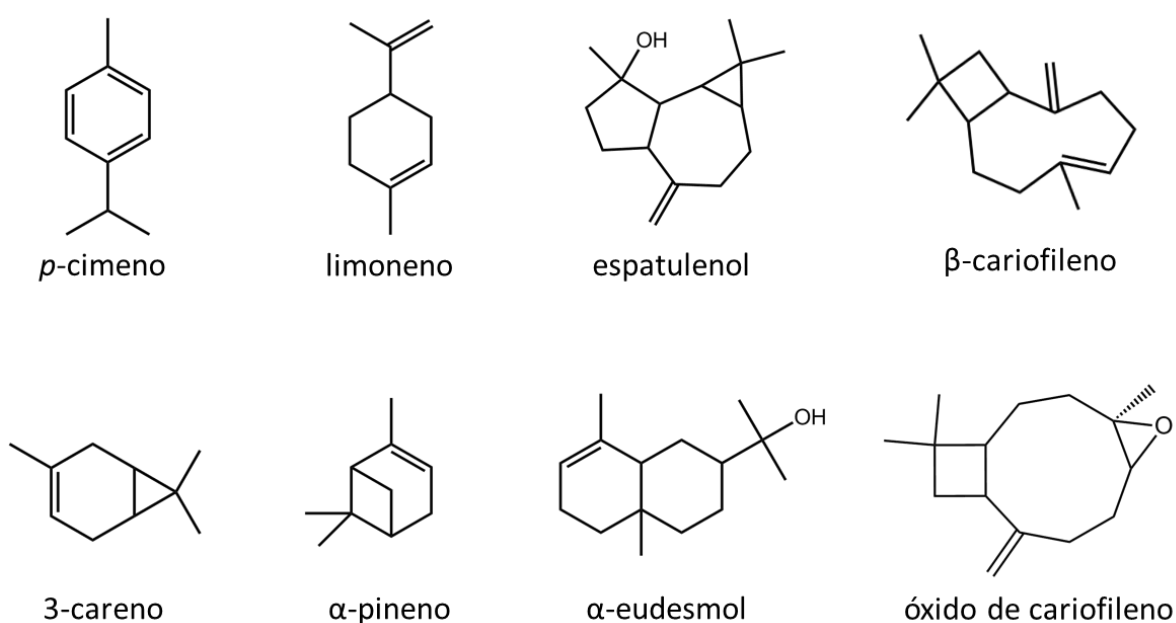


Figura 10. Principais mono e sesquiterpenos identificados no extrato hexânico dos resíduos.

Em relação à atividade biológica o óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolia* apresentou atividade antibacteriana significativa contra a bactéria *Enterococcus faecium* (ATCC 19434) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813). Em sua caracterização foram identificados como principais componentes os monoterpenos α -felandreno, α -pineno e limoneno (ENNIGROU et al., 2018). Cole (2008) verificou as atividades inseticida e larvicida do óleo essencial de *S. terebinthifolia* contra mosquitos de *A. aegypti*. A análise do óleo revelou a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o 3-careno, limoneno, α -felandreno, α -pineno, mirceno e o-cimeno os predominantes. Matsuo et al. (2011) descreveram pela primeira vez o

efeito antiapoptótico e antimetastático do α -pineno isolado de *S. terebinthifolia* em modelo melanoma *in vivo*.

O espatulenol apresenta atividade biológica importante com propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica (LIMBERGER et al., 2004). Outros componentes que também apresentam atividade biológica são o β -cariofileno e o óxido de cariofileno, relatados com potencial atividade anticarcinogênica (ZHENG et al., 1992). Foi observada a atividade antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* para o óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolia* do Egito, particularmente rico em β -terpineol e β -cariofileno (EL-MASSRY et al., 2009). Esses dados demonstram o potencial dos principais terpenos identificados na amostra analisada.

4.2.2 Extrato diclorometânico

No perfil cromatográfico do extrato diclorometânico observa-se a predominância de picos na região triterpênica compreendida entre 45 e 54 minutos (Figura 11). Na amostra foi verificada a presença do esteroide β -sitosterol (11,29%) juntamente com os compostos 28-norolean-17-en-3-ona (29,18%), lupenona (8,04%) e lupeol (9,08%) que também foram identificados no extrato hexânico.

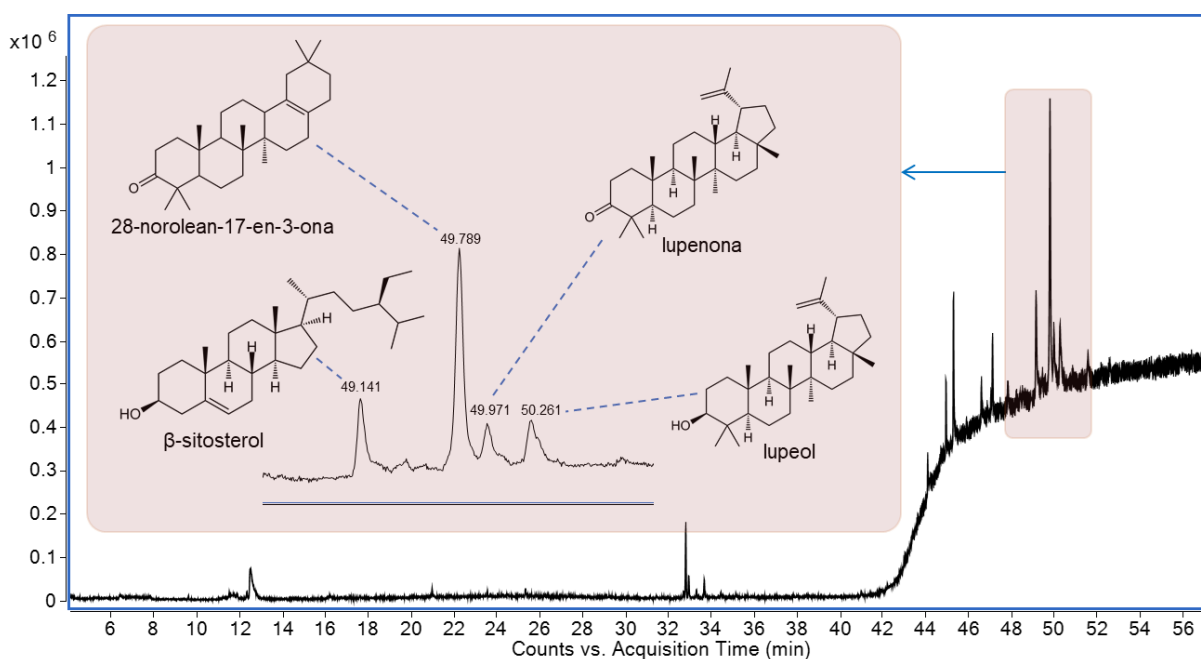


Figura 11. Cromatograma do extrato diclorometânico dos resíduos.

Os compostos separados por cromatografia gasosa devem ser gases ou substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando os compostos não apresentam essas características, caso em que tem elevada massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares há necessidade de derivatização (COLLINS et al., 2006). Com isso, o extrato diclorometânico passou pelo processo de esterificação de forma a possibilitar a identificação de compostos que não apresentam as características necessárias para análise de cromatografia gasosa. Após esse processo a amostra foi analisada originando o cromatograma apresentado na Figura 12.

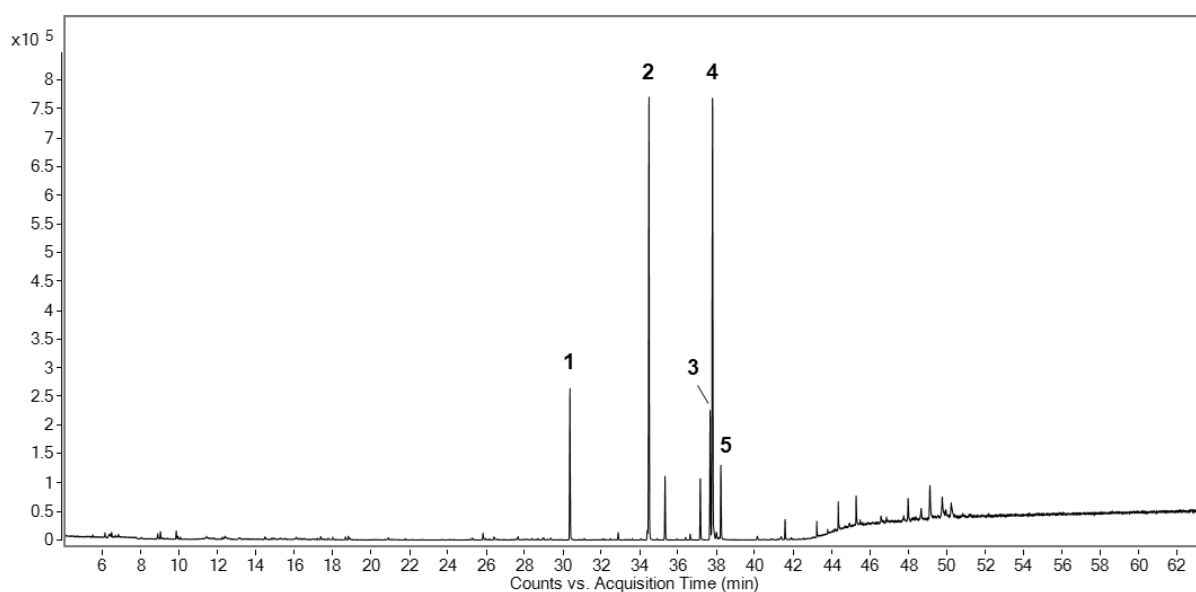


Figura 12. Cromatograma do extrato diclorometânico esterificado.

Observa-se a presença de sinais que não foram detectados no cromatograma anterior, demonstrando que o processo de esterificação possibilitou a identificação de outras substâncias presentes na amostra, conforme Tabela 5.

Tabela 5. Composição química do extrato diclorometânico esterificado.

Nº	RT	Área (%)	Substância proposta	IR
1	30,352	8,74	tetradecanoato de metila	1725
2	34,472	26,51	hexadecanoato de metila	1928
3	37,658	7,69	linoleato de metila	2098
4	37,783	31,21	linolenato de metila	2104
5	38,218	4,60	estearato de metila	2129

Foi possível identificar ésteres dos ácidos mirístico, palmítico, linoleico, linolênico e esteárico, com os ácidos linolênico e palmítico sendo responsáveis por aproximadamente 58% da área total. Recentemente, a composição de ácidos graxos foi determinada nas folhas e galhos de *S. terebinthifolia*. Treze ácidos graxos foram identificados com os principais componentes sendo os ácidos α -linolênico, palmítico e linoleico (ENNIGROU et al., 2018).

Em uma comparação dos cromatogramas (Figura 13) é possível verificar a diferença entre os perfis cromatográficos obtidos dos extratos diclorometânicos analisados. Na amostra esterificada, picos intensos relacionados aos ésteres metílicos de ácidos graxos aparecem na região entre 30 e 38 minutos, com diminuição dos picos da região triterpênica. A presença destes sinais demonstra a alta concentração de ácidos graxos e indica um processo de esterificação satisfatório, permitindo a identificação desses ácidos na forma de seus ésteres metílicos.

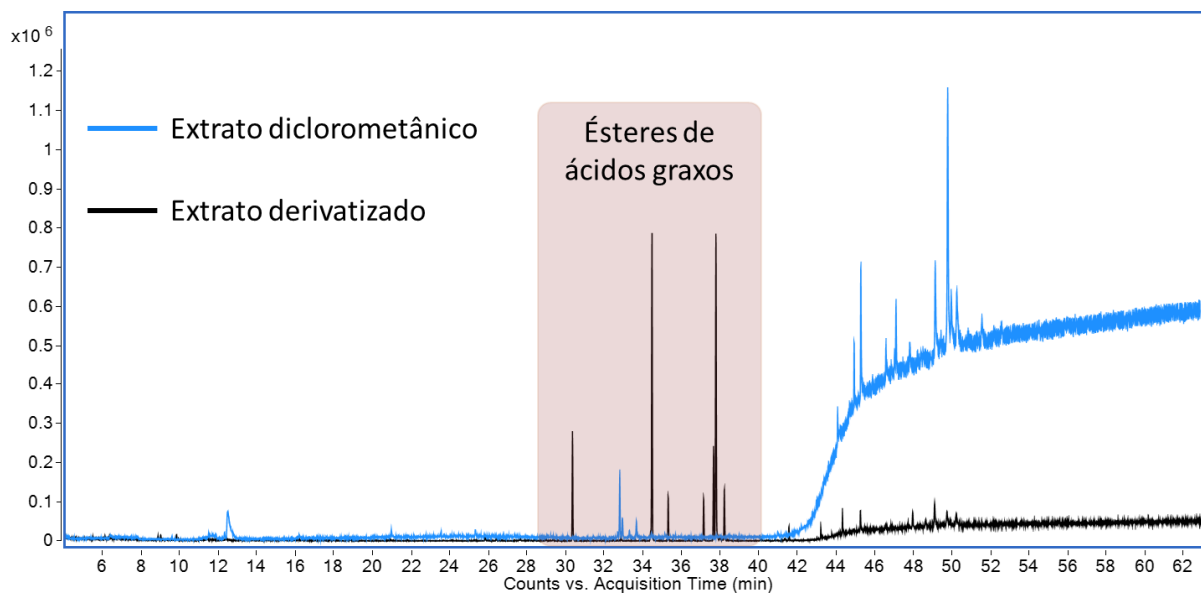


Figura 13. Comparação entre os cromatogramas obtidos dos extratos diclorometânico e diclorometânico esterificado.

4.3 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS

4.3.1 Análise do extrato diclorometânico

No espectro de massas obtido (Figura 14) as regiões que apresentaram os sinais mais intensos estão relacionadas às principais classes de compostos identificados, triterpenos ácidos (de m/z 453 a 503) e ácidos graxos (de m/z 227 a 339). Entre os triterpenos ácidos, dois dos principais encontrados em *S. terebinthifolia* foram identificados: ácido masticadienoico (m/z 453) e schinol (m/z 455) (JAIN et al., 1995; MORAIS et al., 2014). Além disso, outros nove íons tiveram fórmulas moleculares associadas a triterpenos ácidos, sendo uma delas na forma de glicosídeo. Esses resultados indicam a presença de substâncias ainda não isoladas dessa planta.

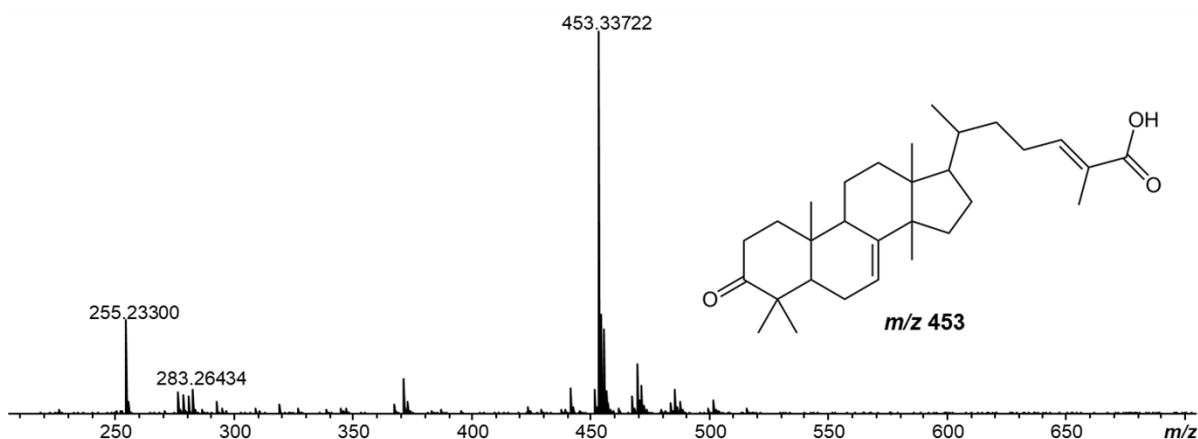


Figura 14. Espectros de massas ESI (-) FT-ICR do extrato diclorometânico.

Esta espécie produz ácidos graxos e terpenoides, principalmente os derivados do schinol e do ácido masticadienoico, sendo caracterizados por serem inibidores competitivos específicos da fosfolipase A2, indicando uma possível atividade anti-inflamatória (JAIN et al., 1995). O schinol também apresentou atividade antifúngica contra diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* (JOHANN et al., 2010). Estudando plantas naturais do Mediterrâneo, Karygianni et al. (2014) verificaram que extratos contendo triterpenos ácidos foram ativos contra bactérias orais.

A análise do extrato diclorometânico por ESI (-) FT-ICR MS possibilitou a identificação de 21 compostos (Tabela 6).

Tabela 6. Substâncias propostas para o extrato diclorometânico do resíduo após ESI (-) FT-ICR MS.

[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Erro (ppm)	DBE ^a	Substância proposta
227,20176	-	C ₁₄ H ₂₇ O ₂	-0.46	1.5	ácido mirístico
241,21746	-	C ₁₅ H ₂₉ O ₂	-0.63	1.5	ácido pentadecanóico
255,23300	-	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	-0.18	1.5	ácido palmítico
269,24865	-	C ₁₇ H ₃₃ O ₂	-0.18	1.5	ácido heptadecanóico
277,21739	-	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	-0.32	4.5	ácido linolênico
279,23302	-	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	-0.22	3.5	ácido linoleico
281,24870	-	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	-0.34	2.5	ácido oleico
283,26434	-	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	-0.31	1.5	ácido esteárico
311,29568	-	C ₂₀ H ₃₉ O ₂	-0.41	1.5	ácido eicosanóico
339,32691	-	C ₂₂ H ₄₃ O ₂	-0.15	1.5	ácido behênico
453,33722	407	C ₃₀ H ₄₅ O ₃	0.45	8.5	ácido masticadienoico
455,35305	173	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	0.04	7.5	schinol
467,31677	423, 407	C ₃₀ H ₄₃ O ₄	-0.18	9.5	triterpeno ácido
469,33235	439, 425, 409, 369	C ₃₀ H ₄₅ O ₄	-0.03	8.5	triterpeno ácido
471,34808	-	C ₃₀ H ₄₇ O ₄	-0.20	7.5	triterpeno ácido
483,31170	-	C ₃₀ H ₄₃ O ₅	-0.20	9.5	triterpeno ácido
485,32732	455, 423, 387	C ₃₀ H ₄₅ O ₅	-0.14	8.5	triterpeno ácido
487,34299	-	C ₃₀ H ₄₇ O ₅	-0.19	7.5	triterpeno ácido
501,32231	-	C ₃₀ H ₄₅ O ₆	-0.30	8.5	triterpeno ácido
503,33799	-	C ₃₀ H ₄₇ O ₆	-0.35	7.5	triterpeno ácido
633,40121	453, 179	C ₃₆ H ₅₇ O ₉	-0.63	8.5	triterpeno glicosídeo

^aNúmero de insaturações e anéis (double bound equivalent).

Esses resultados estão de acordo com da Silva J.H.S. et al. (2017) que identificaram por ESI(-)-TOF MS a presença de ácidos graxos (mirístico, palmítico, esteárico, entre outros) e triterpenos ácidos ao analisar diferentes frações de extratos etanólicos de frutos e folhas de *S. terebinthifolia*. Ao estudar compostos antifúngicos do extrato hidroetanólico das folhas desta planta, Johann et al. (2010) isolaram o schinol da fração hexânica e identificaram por ESI MS e RMN. Anos depois Vieira et al. (2015) isolaram os ácidos 3β-masticadienólico (schinol) e masticadienônico ao realizar o fracionamento de um extrato diclorometânico dos frutos.

Sánchez-Monroy et al. (2017) investigaram a atividade antitumoral dos ácidos masticadienônico e 3 α -hidroximasticadienônico isolados de *Amphipterygium adstringens* (Anacardiaceae) em um modelo de xenoinxerto de câncer de próstata de rato. Os resultados mostraram que os dois triterpenos inibiram o crescimento do tumor, tiveram efeito antiproliferativo *in vivo* e induziram morte celular por apoptose.

4.3.2 Análise dos extratos polares

Após a análise foram obtidos os espectros de massas dos extratos metanólico (EM) e hidroetanólico dos resíduos (EHid) bem como do extrato hidroetanólico das cascas dos frutos (ECF) (Figura 15). Os sinais mais intensos foram m/z 183 (galato de metila), m/z 353 (hexosídeo do ácido quínico) e m/z 325 (ácido galoilchiquímico), para EM, EHid e ECF, respectivamente.

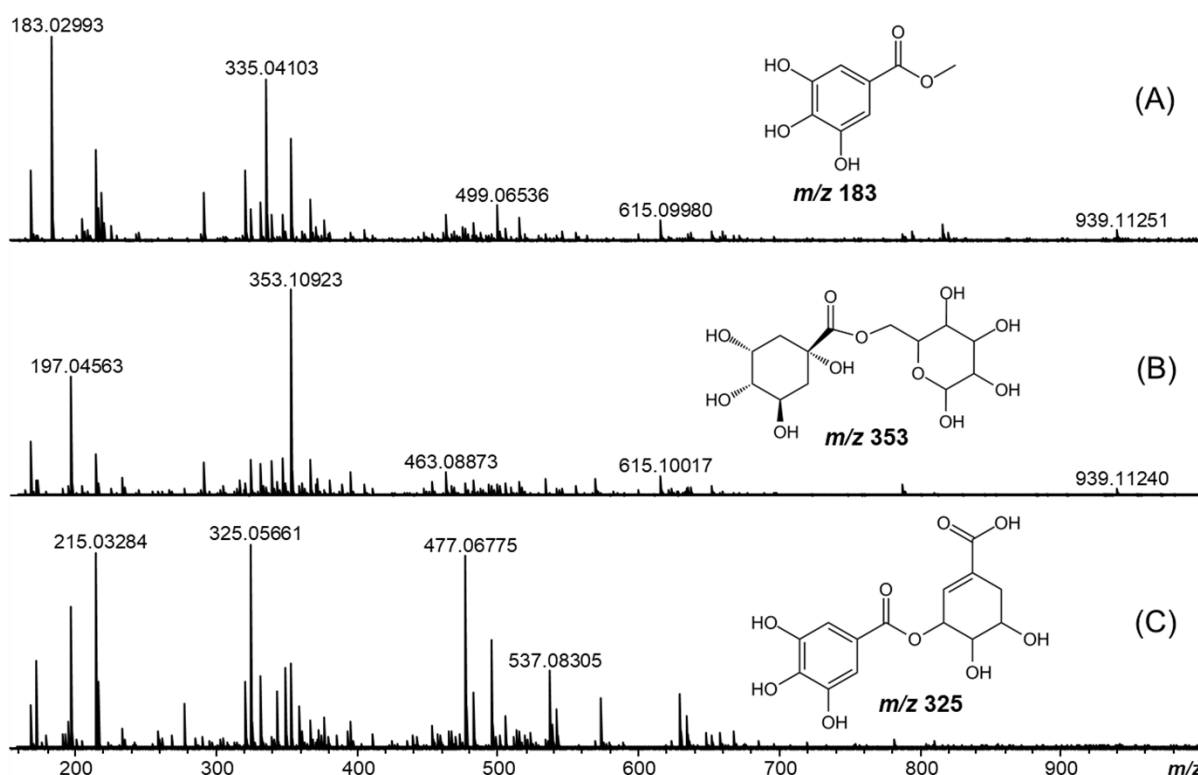


Figura 15. Espectros de massas ESI (-) FT-ICR MS: (A) Extrato metanólico, (B) Extrato hidroetanólico dos resíduos, (C) Extrato hidroetanólico das cascas dos frutos.

A composição dos extratos polares analisados por ESI(-)FT-ICR MS é apresentada na Tabela 7, onde as substâncias ou classes foram propostas com base nos íons gerados, fórmula molecular proposta, número de insaturações e anéis (DBE) e dados da literatura referente à identificação das substâncias na espécie, gênero ou família.

A literatura descreve a identificação do ácido gálico e seus derivados nas folhas e frutos de *S. terebinthifolia* (CERUKS et al., 2007; SANTANA et al., 2012; FEUEREISEN et al., 2014; CAMAROTI et al., 2018). O íon da molécula desprotonada em m/z 169, seu aduto com cloreto (m/z 205) e seu dímero $[2M-H]^-$ de m/z 339 confirmam a presença desta substância. Em relação a seus derivados, os íons m/z 183 e 197 sugerem a presença dos galatos de metila e etila, respectivamente, além de seus adutos com cloreto (m/z 219 e 233). Além do ácido gálico, o ácido chiquímico (m/z 173) também foi identificado na forma desprotonada, sendo este um dos precursores da biossíntese de compostos fenólicos (DEWICK, 2009).

Tabela 7. Substâncias identificadas por ESI (-) FT-ICR MS nos extratos polares dos resíduos e das cascas dos frutos.

$[M-H]^-$ (m/z)	MS/MS	Fórmula Molecular $[M-H]^-$	Erro [ppm]	DBE ^a	Substância Proposta	EM	Ehid	ECF
169,01428	-	C ₇ H ₅ O ₅	-0,20	5	ácido gálico	+	+	+
173,04559	-	C ₇ H ₉ O ₅	-0,26	3	ácido chiquímico	+	+	+
179,05609	-	C ₆ H ₁₁ O ₆	0.09	1	monossacarídeo	-	-	+
183,02993	168	C ₈ H ₇ O ₅	-0,19	5	galato de metila	+	-	-
197,04559	169, 168	C ₉ H ₉ O ₅	-0,21	5	galato de etila	-	+	+
204,99097	169	C ₇ H ₆ ClO ₅	-0,20	5	ácido gálico / Cl ⁻	+	-	+
215,03284	179	C ₆ H ₁₂ ClO ₆	-0,23	1	monossacarídeo / Cl ⁻	+	+	+
219,00666	183	C ₈ H ₈ ClO ₅	-0,08	5	galato de metila / Cl ⁻	+	-	-
233,02229	197	C ₉ H ₁₀ ClO ₅	-0,28	5	galato de etila / Cl ⁻	-	+	+
301,03530	-	C ₁₅ H ₉ O ₇	0,25	11	quercetina	+	+	-
317,03055	-	C ₁₅ H ₉ O ₈	-0,81	11	miricetina	+	-	-
321,02537	169	C ₁₄ H ₉ O ₉	-0,51	10	ácido digálico	+	+	+
325,05661	169	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	-0,33	8	ácido galoilchiquímico	+	+	+
331,06723	271, 241, 211, 169	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	-0,47	6	galoilglicose	+	+	+
335,04098	183	C ₁₅ H ₁₁ O ₉	-0,38	10	éster digalato de metila	+	-	-
339,03596	169	C ₁₄ H ₁₁ O ₁₀	-0,57	2	cluster de ácido gálico	+	+	+
341,10920	-	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	-0,77	7	dissacarídeo	-	+	-
343,06722	191, 173, 169	C ₁₄ H ₁₅ O ₁₀	-0,44	10	ácido galoilquínico	-	+	+
349,05666	197	C ₁₆ H ₁₃ O ₉	-0,43	10	éster digalato de etila	-	+	+
353,10913	179, 173	C ₁₃ H ₂₁ O ₁₁	-0,55	3	hexosídeo do ácido quínico	+	+	+

359,11972	179, 161	C ₁₂ H ₂₃ O ₁₂	-0.61	1	dissacarídeo / H ₂ O	-	+	+
367,04392	331	C ₁₃ H ₁₆ ClO ₁₀	-0.47	5	galoilglicose / Cl ⁻	+	-	+
377,08584	341, 215, 179	C ₁₂ H ₂₂ ClO ₁₁	-0.60	1	dissacarídeo / Cl ⁻	+	+	+
433,07793	-	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	-0,67	12	flavonoide	+	-	-
447,09364	301, 273, 271, 179	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-0,79	12	quercitrina	+	-	-
449,07280	-	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	-0,56	12	flavonoide	+	-	-
453,33762	407	C ₃₀ H ₄₅ O ₃	-0.45	8	ácido masticadienoico	-	+	+
455,35321	173	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	-0.30	7	schinol	-	+	+
463,08855	317, 179	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-0,76	12	miricitrina	+	+	+
469,33231	439, 425, 409, 369	C ₃₀ H ₄₅ O ₄	0.05	8	triterpeno ácido	-	+	+
471,34861	-	C ₃₀ H ₄₇ O ₄	-1.33	7	triterpeno ácido	-	+	-
477,06775	325, 313, 289, 263, 169	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	-0.59	13	ácido digaloilchiquímico	-	+	+
477,10413	-	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	-0.59	12	flavonoide	+	+	+
479,08363	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	-1,07	12	flavonoide	+	+	-
483,07835	439, 331, 313, 271, 169	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄	-0.67	11	digaloilglicose	+	+	+
485,32768	455, 423, 387	C ₃₀ H ₄₅ O ₅	-0.89	8	triterpeno ácido	-	+	-
493,06275	-	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₄	-0,76	13	flavonoide	+	+	-
495,07832	343, 191, 169	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	-0.59	12	ácido digaloilquínico	+	+	+
499,06536	463	C ₂₁ H ₂₀ ClO ₁₂	-0,96	11	miricitrina / Cl ⁻	+	+	-
501,32251	-	C ₃₀ H ₄₅ O ₆	-0.69	8	triterpeno ácido	-	+	-
537,08305	443, 375	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	-0.61	22	agatisflavona/amentoflavona	-	+	+
541,11446	415, 389	C ₃₀ H ₂₁ O ₁₀	-0.81	20	tetraidroamentoflavona ou tetraidrorobustaflavona	-	+	+
599,10484	447, 301	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₅	-1,00	17	quercitrina O-galato	+	+	-
615,09980	463, 317	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	-1,04	17	miricitrina O-galato	+	+	-
629,07902	477, 325	C ₂₈ H ₂₁ O ₁₇	-0,96	18	ácido trigaloilchiquímico	-	-	+
633,40135	453, 179	C ₃₆ H ₅₇ O ₉	-0.86	8	glicosídeo triterpeno	-	+	+
635,08929	483, 465	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₈	-0.48	16	trigaloilglicose	+	+	+
635,41745	455, 179	C ₃₆ H ₅₉ O ₉	-1.57	7	glicosídeo triterpeno	-	-	+
649,39632	469, 179	C ₃₆ H ₅₇ O ₁₀	-0.92	8	glicosídeo triterpeno	-	-	+
939,11240	787, 769, 635, 617	C ₄₁ H ₃₁ O ₂₆	-1.59	26	pentagaloilglicose	+	+	-

^aNúmero de insaturações e anéis (double bond equivalent); (+) - substância presente; (-) - substância ausente.

Alguns açúcares foram identificados nas amostras como dissacarídeos (*m/z* 341), monossacarídeos (*m/z* 179) e seus adutos com cloreto (*m/z* 215 e 377), principalmente nas cascas dos frutos. O dissacarídeo também foi detectado como cluster com a água (*m/z* 359).

A presença de flavonoides foi detectada em m/z 301, 317, 433, 447, 449, 463, 477, 479 e 493. Alguns deles foram encontrados em *S. terebinthifolia*, como quercetina (m/z 301), quercitrina (m/z 447), miricetina (m/z 317) e miricitrina (m/z 463) (CERUKS et al., 2007; CARVALHO et al., 2013). A miricitrina foi identificada formando um aduto com o ânion cloreto (m/z 499) e em uma estrutura mais complexa de m/z 615. Da mesma forma, a quercitrina também foi detectada como parte de outra estrutura de m/z 599. Experimentos ESI(-) MS/MS foram realizados para auxiliar na identificação desses compostos formados por esses flavonoides (Figura 16).

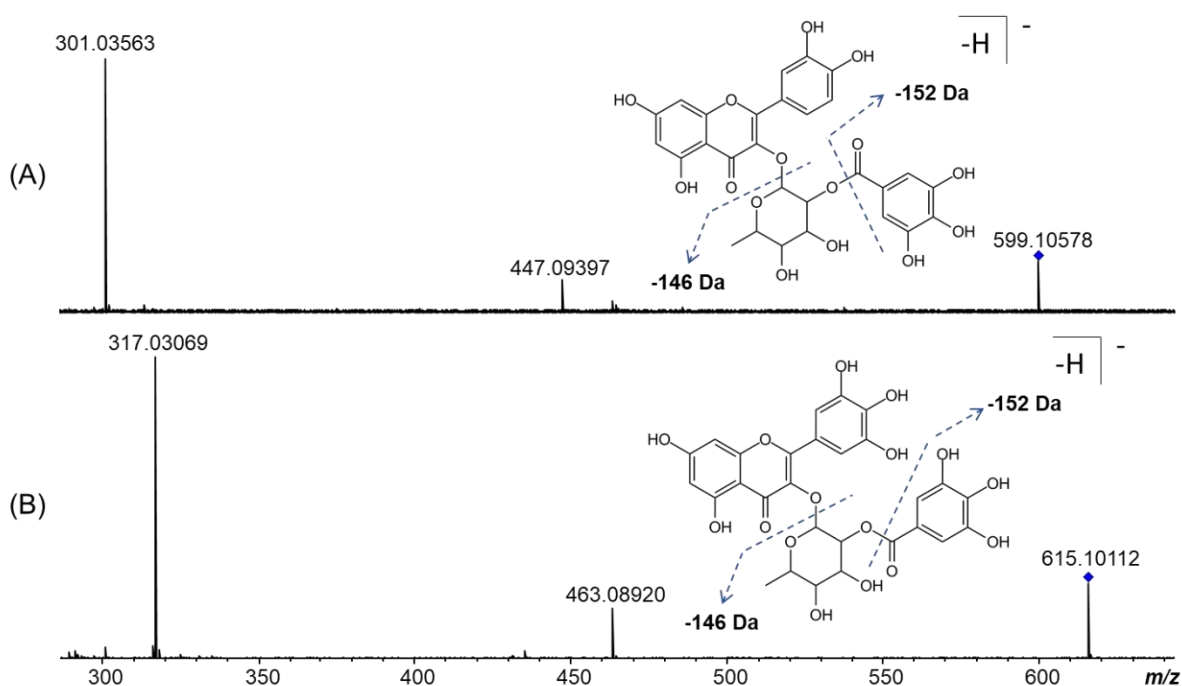


Figura 16. ESI (-) MS/MS – Proposta de fragmentação dos íons m/z 599 (A) e 615 (B).

Os íons das moléculas desprotonadas em m/z 599 e 615 foram identificados como quercitrina O-galato e miricitrina O-galato. As duas estruturas perdem a fração galoila (-152 Da) formando os fragmentos m/z 447 (quercitrina) e 463 (miricitrina) que, com subsequente perda da fração glicídica (-146 Da), originam m/z 301 e 317 sinais característicos das agliconas quercetina e miricetina, respectivamente. Compostos similares foram identificados em frutos de *Rhus coriaria* L. (Anacardiaceae) (ABU-REIDAH et al., 2015). O derivado de quercitrina é aqui relatado pela primeira vez em *S. terebinthifolia*, não encontrando, até o presente momento, relatos na literatura.

Sinais em m/z 537 e 541 relacionados a biflavonoides foram identificados. Eles são agatisflavona ou seu isômero amentoflavona para m/z 537 e tetraidroamentoflavona ou seu isômero tetraidrorobustaflavona em m/z 541. A literatura descreve a presença dessas substâncias nos frutos de *S. terebinthifolia* (FEUEREISEN et al., 2017; MUHS et al., 2017).

Os extratos polares foram abundantes em galotaninos e estas substâncias foram responsáveis por alguns dos sinais mais intensos dos espectros de massas. O íon em m/z 331 foi identificado como galoilglicose. Os principais fragmentos formados a partir de MS/MS (Tabela 7) foram relacionados a duas perdas de duas porções de formaldeído $[M-H-60]^-$ e $[M-H-60-60]^-$ da glicose originando os íons m/z 271 e 211, respectivamente (TAN et al., 2011). Além da perda de glicose $[M-H-162]^-$ para originar o íon em m/z 169. O íon m/z 483 (digaloilglicose) sofreu descarboxilação $[M-H-44]^-$ (m/z 439) e mostrou perda de uma fração galoila (-152 Da) e de ácido gálico (-170 Da) formando os sinais m/z 331 e 313, respectivamente. O íon de m/z 635 perdeu galoila $[M-H-152]^-$ (m/z 483) e ácido gálico $[M-H-170]^-$ (m/z 465) e foi identificado como trigaloilglicose. O íon de m/z 939 também perde galoila (-152 Da) e ácido gálico (-170 Da) para dar os íons m/z 787 e 769, respectivamente. Uma perda adicional destas estruturas pode também ser verificada com os sinais de m/z 635 e 617. Os fragmentos mostrados correspondem à molécula de pentagaloilglicose (Figura 17).

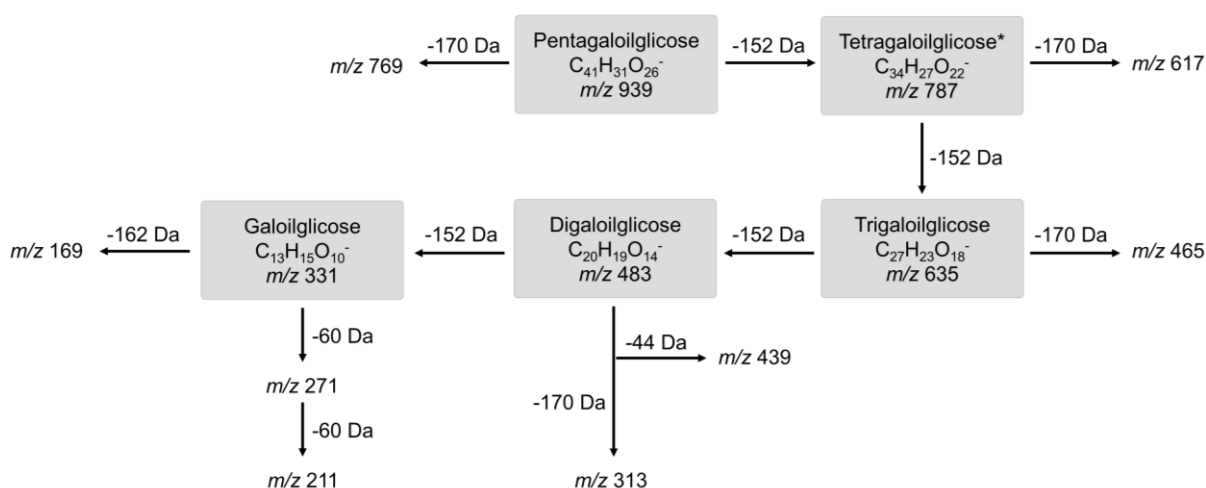


Figura 17. Fragmentação obtida para as galoilglicoses. (*Identificado apenas na fragmentação).

A dissociação induzida por colisão (CID) do íon m/z 325 mostrou a presença de um fragmento de m/z 169 para o ácido gálico desprotonado como resultado da perda de um resíduo de chiquimato (-156 Da). Com base nesta informação, o ácido galoilchiquímico foi a substância proposta. Para o íon m/z 477, o ácido digaloilchiquímico foi atribuído a ele, uma vez que forneceu o fragmento de m/z 325 originado da perda de galoila (-152 Da) e o fragmento m/z 169. O íon m/z 629 apresentou os sinais 477 e 325 gerados pela perda consecutiva de unidades de galoila. Este íon foi atribuído ao ácido trigaloilchiquímico (Figura 18). Os galotaninos, os compostos de galoilglicose e ácidos galoilchiquímicos são descritos como metabólitos identificados em *S. terebinthifolia* (CAVALHER-MACHADO et al., 2008; FEUEREISEN et al., 2014).

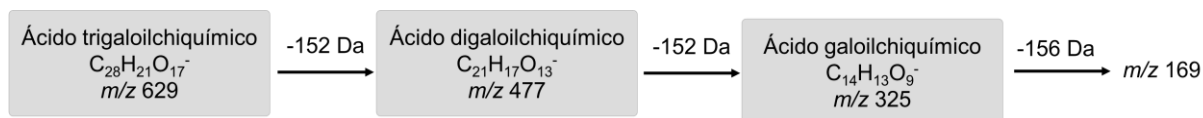


Figura 18. Fragmentação obtida para os ácidos galoilchiquímicos.

As moléculas desprotonadas em m/z 335 e 349 mostraram perda de uma fração de galoila (-152 Da) formando os fragmentos m/z 183 e 197, respectivamente. Os compostos foram caracterizados como éster digalato de metila e éster digalato de etila. Os íons m/z 343 e 495 foram identificados como os ácidos mono- e digaloilquínicos devido à perda sequencial de galoila (-152 Da) e à formação dos íons m/z 191 (ácido quínico desprotonado) e m/z 169 (ácido gálico desprotonado). Na fragmentação do íon m/z 353 foram formados sinais iônicos em m/z 179 pela perda de uma fração do ácido quínico (-174 Da) e em m/z 173 devido à formação desse ácido com a sua subsequente desidratação. Estes fragmentos sugerem que esta substância é o hexosídeo do ácido quínico. Os espectros ESI (-) MS/MS de algumas substâncias estão apresentados nas Figuras 19 e 20.

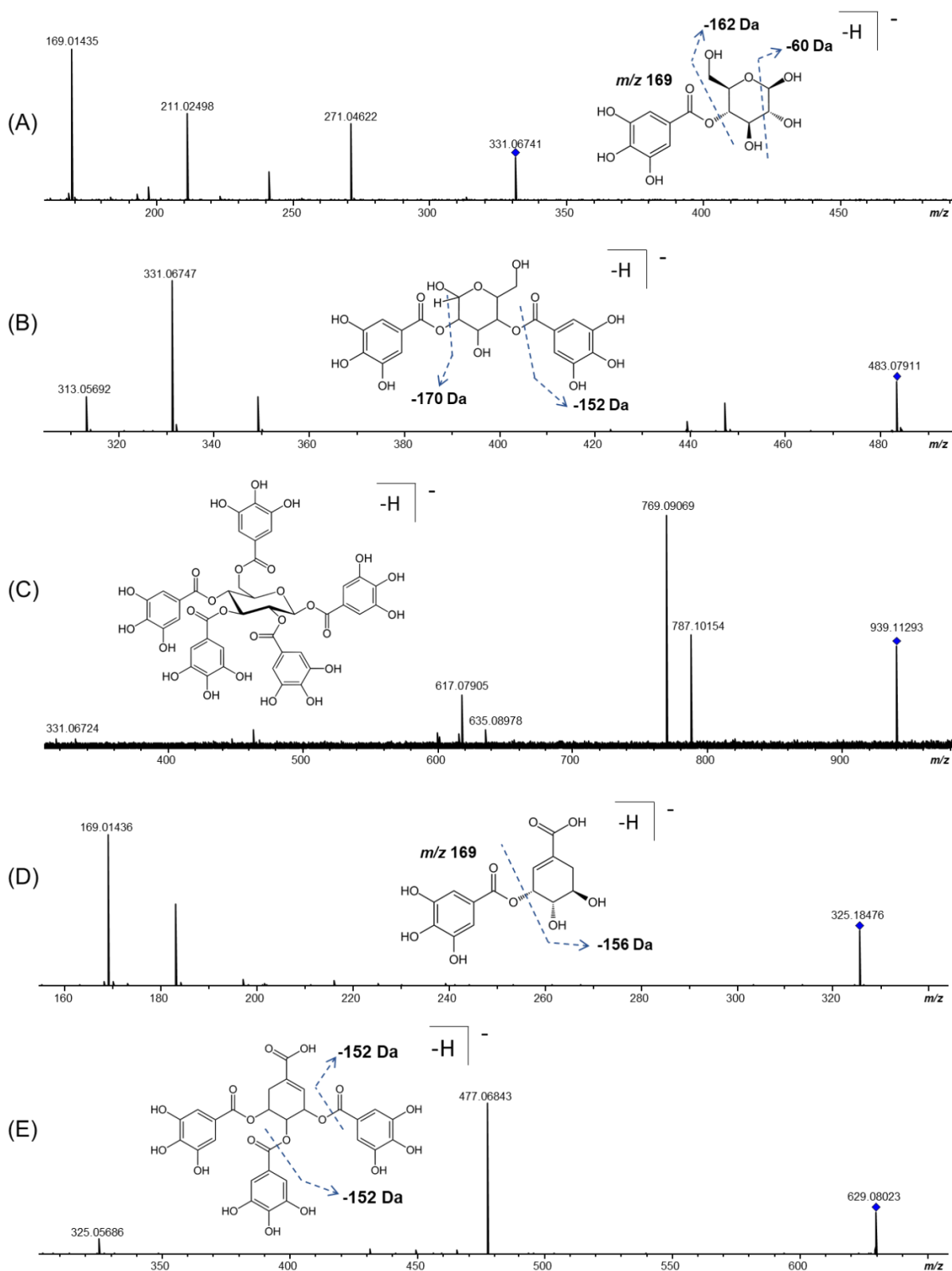


Figura 19. ESI (-) MS/MS – Proposta de fragmentação dos íons m/z 331 (A), 483 (B), 939 (C), 325 (D) e 629 (E).

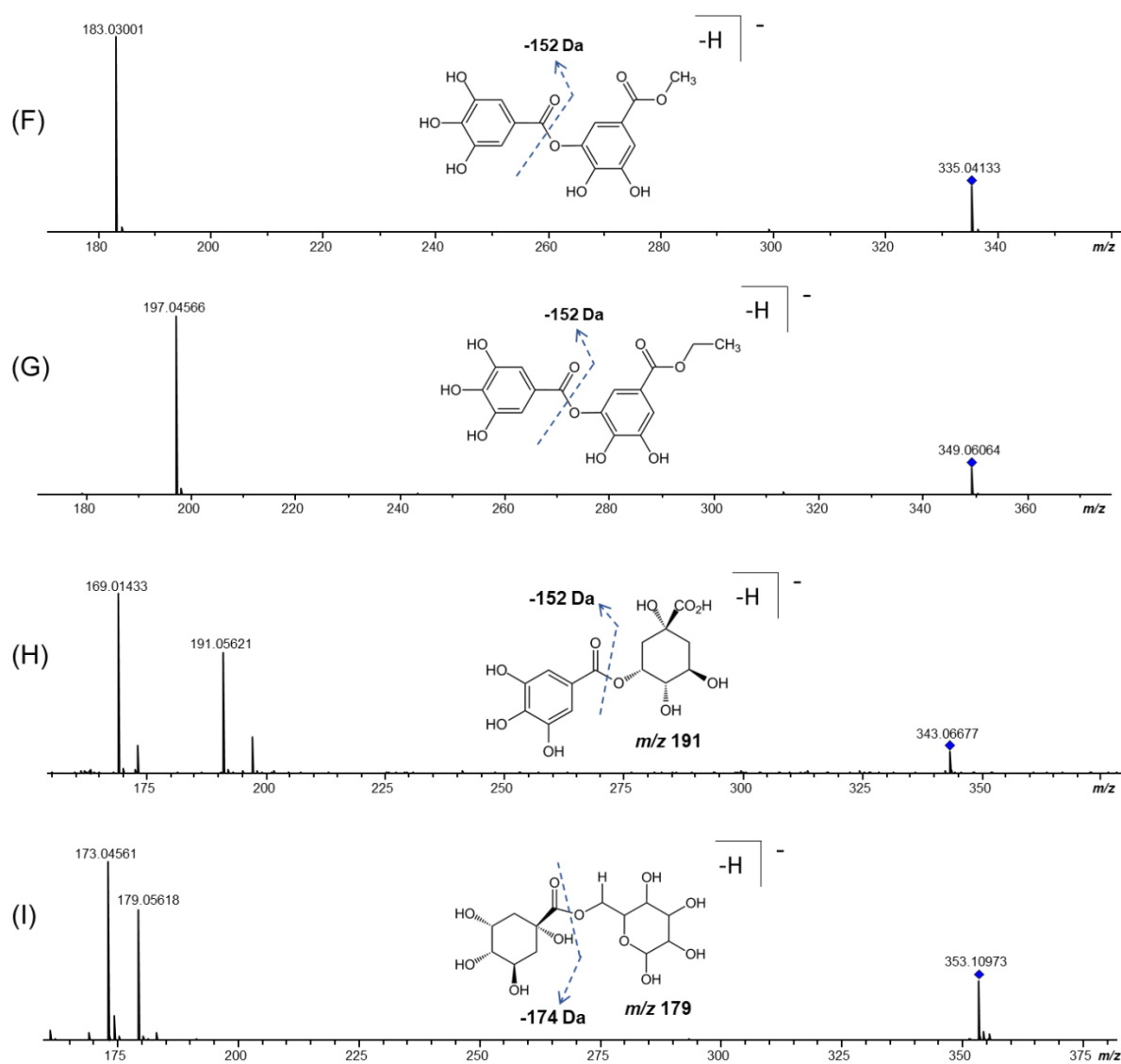


Figura 20. ESI (-) MS/MS – Proposta de fragmentação dos íons m/z 335 (F), 349 (G), 343 (H) e 353 (I).

Foi observada a presença do galato de metila (m/z 183) no extrato metanólico e do galato de etila (m/z 197) nos extratos hidroetanólicos. Suspeita-se que o solvente extrator tenha reagido com alguma substância presente na amostra originando os galatos em questão. Com isso, extratos dos resíduos foram preparados com diferentes solventes (metanol, etanol, água e acetona) e analisados pela mesma técnica (ESI (-) FT-ICR MS) com o objetivo de verificar o aparecimento dos sinais correspondentes aos galatos (Figura 18).

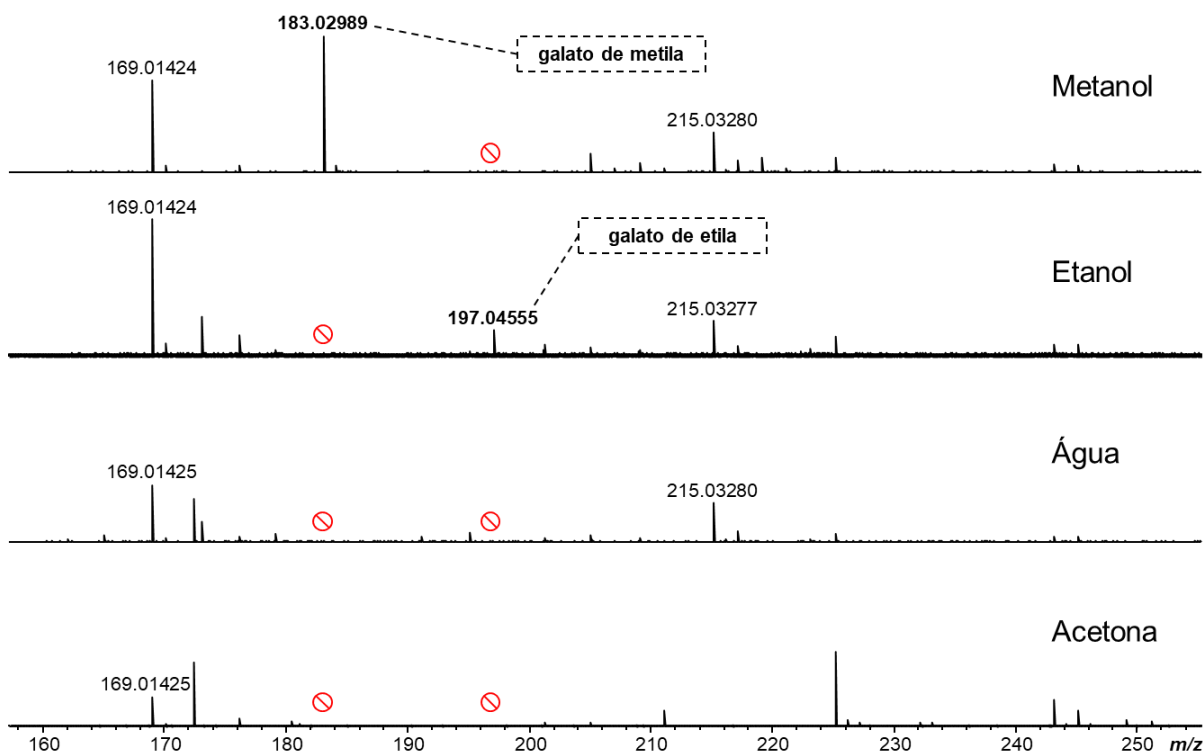


Figura 21. Espectros dos extratos preparados com metanol, etanol, água e acetona.

Os dados espectrais demonstram a presença do galato de metila (m/z 183) no extrato metanólico, enquanto o galato de etila (m/z 197) foi identificado apenas no extrato etanólico. Observou-se a ausência desses íons nos outros extratos indicando a interferência do solvente extrator na produção desses galatos. Estudos em que o metanol foi usado como solvente extrator descreveram a identificação do galato de metila (CAVALHER-MACHADO et al., 2008; ROSAS et al., 2015; DA SILVA M. M. et al., 2017). Em contraste, aqueles que utilizaram etanol como solvente extrator descreveram galato de etila (BULLA et al., 2015; DA SILVA J.H.S. et al., 2017). Há também artigos que relatam as duas substâncias (CERUKS et al., 2007; SANTANA et

al., 2012), mas o extrato da planta teve contato com ambos os solventes, um no processo de extração e outro na etapa de purificação. A literatura descreve a reação de metanólise quando galotaninos com maior grau de galoilação são tratados com metanol originando produtos como galato de metila, éster digalato de metila e pentagaloilglicose. Essa reação é utilizada para auxiliar na quantificação por HPLC de taninos hidrolisáveis presentes nos alimentos (CHEN e HAGERMAN, 2004; NEWSOME et al., 2016). Uma outra indicação do efeito do solvente foi a presença do éster digalato de metila (m/z 335) apenas no extrato metanólico e éster digalato de etila (m/z 349) no extrato hidroetanólico (Tabela 7). Portanto, é possível supor que a formação dessas substâncias ocorre durante a preparação dos extratos, uma vez que os taninos hidrolisáveis sob aquecimento (por exemplo, durante a concentração do extrato) podem sofrer solvólise. A Figura 19 apresenta a reação entre o solvente e os taninos hidrolisáveis presentes no extrato. Ao realizar o ataque nucleofílico representado pela seta azul, o solvente induzirá a produção de éster de galato de metila ou etila. Outra possibilidade seria a reação indicada pela seta vermelha produzindo galato de metila ou etila.

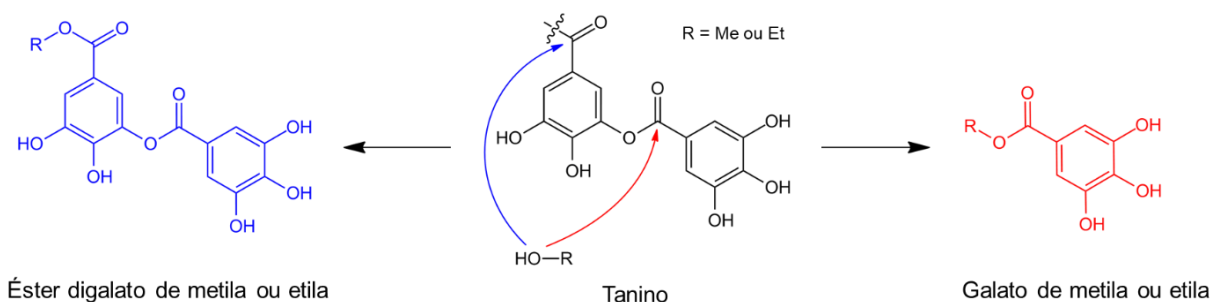


Figura 22. Reação entre o solvente (metanol ou etanol) e um tanino hidrolisável com maior grau de galoilação.

4.4 Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana estão apresentados na Tabela 8. Os extratos EM e Ehid foram os mais ativos, principalmente contra bactérias Gram-positivas. A maior sensibilidade dessas cepas pode estar relacionada com a diferença na constituição e arranjo da membrana celular desses microrganismos em relação aos Gram-negativos (KOŁODZIEJCZYK et al., 2013).

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos dos resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa - *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Espécies	Cepas	EM		Ehid		ECF		ED		EH	
		CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a
<i>S. aureus</i>	10A	0,90	>2,70	0,90	>2,70	1,50	>2,70	2,40	>2,70	2,40	>2,70
	23A	0,90	1,80	0,60	1,80	1,20	>2,70	>2,70	>2,70	2,70	>2,70
	35A	0,60	1,80	0,60	1,80	1,50	>2,70	>2,70	>2,70	2,40	>2,70
	67A	0,60	2,10	0,90	1,80	1,50	>2,70	>2,70	>2,70	2,40	>2,70
	114A	0,60	2,70	0,60	1,80	1,20	>2,70	>2,70	>2,70	2,40	>2,70
	ATCC 29213	0,60	>2,70	0,90	>2,70	1,80	>2,70	1,80	>2,70	2,40	>2,70
<i>E. faecium</i>	70E	1,50	2,10	2,10	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
	101E	1,50	2,70	1,80	>2,70	2,10	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
<i>E. faecalis</i>	1277	1,50	2,70	1,80	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
	6885	1,20	2,70	2,10	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
	168557	1,20	2,70	1,80	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
	ATCC 29212	1,20	1,80	1,20	2,70	1,50	>2,70	2,40	>2,70	>2,70	>2,70
<i>A. baumannii</i>	30B	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	2,40	>2,70	>2,70	>2,70
	101B	1,20	>2,70	1,80	>2,70	2,70	>2,70	2,40	>2,70	>2,70	>2,70
	ATCC 19606	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	2,40	>2,70	>2,70	>2,70
<i>P. aeruginosa</i>	34B	2,40	>2,70	2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
	39B	2,40	>2,70	2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
	121B	2,40	>2,70	2,40	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70
	ATCC 27853	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70	>2,70

^aValores expressos em mg/mL

As cepas mais suscetíveis foram as de *S. aureus* com os dois extratos apresentando CIM 0,6 – 0,9 mg/mL e CBM a partir de 1,80 mg/mL. Para as cepas 10A e ATCC 29213 a CBM não foi atingida nas concentrações testadas. Esses extratos apresentaram atividade contra as cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* com valores de CIM 1,20 – 1,50 mg/mL e CBM 1,80 – 2,70 mg/mL para EM e CIM 1,20 – 2,10 mg/mL para Ehid, além de inibirem o crescimento de uma cepa de *A. baumannii* (30B) e as três cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes. Embora ECF, ED e EH não tenham efeito bactericida nas concentrações testadas, ECF apresentou atividade inibitória contra as cepas de *S. aureus* (CIM 1,20 – 1,80 mg/mL), *E. faecium* (101E), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *A. baumannii* (101B), ED contra *A. baumannii* (CIM 2,40 mg/mL) e duas cepas de *S. aureus* e EH inibiu o crescimento de *S. aureus* (CIM 2,40 – 2,70 mg/mL). De maneira geral os extratos polares foram mais ativos e essa maior atividade pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos, pois substâncias pertencentes a essa classe como ácido gálico, galato de metila, compostos de galoilglicose e flavonoides apresentam atividade antimicrobiana (KANG et al., 2008; CUSHNIE e LAMB, 2011; ENGELS, GÄNZLE e SCHIEBER, 2012; FARHADI et al., 2018). Os compostos fenólicos também são conhecidos por possuírem forte atividade antioxidante (CAI et al., 2004). Substâncias fenólicas identificadas em extratos de *S. terebinthifolia* foram consideradas responsáveis pela atividade antioxidante observada (EL-MASSRY et al., 2009; BERNARDES et al., 2014; ULIANA et al., 2016; MM DA SILVA et al., 2017; TLILI et al., 2018).

Nossos resultados estão de acordo com a literatura que descreve o potencial antimicrobiano de *S. terebinthifolia*. Ensaio realizado com extratos alcoólicos das folhas frente à *S. aureus* obtiveram valores de CIM próximos aos encontrados no presente estudo, 0,75 mg/mL (EL-MASSRY et al., 2009) e 0,50 mg/mL (ULIANA et al., 2016). As diferenças nos resultados apresentados nesses trabalhos podem estar relacionadas com a variação da composição química de cada um dos extratos. Além da atividade contra *S. aureus* os extratos polares também foram ativos contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* (GUERRA et al., 2000; EL-MASSRY et al., 2009; ULIANA et al., 2016) e *E. faecalis* (COSTA et al., 2012). Em outro estudo o potencial antimicrobiano do extrato dos frutos frente à *S. aureus* e *Bacillus cereus* foi relacionado aos compostos fenólicos presentes na amostra (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e PRADO, 2005). Muhs et al. (2017) verificaram que uma das

frações do extrato metanólico dos frutos apresentou atividade inibitória contra *S. aureus* resistente à meticilina e demonstrou redução significativa na dermonecrose causada por esse microrganismo. Além dos extratos os óleos essenciais também são descritos com atividade antimicrobiana (EL-MASSRY et al., 2009; COLE et al., 2014; ENNIGROU et al., 2018). Inclusive um estudo foi realizado visando a aplicação do óleo essencial como biopreservador alimentar (DA SILVA DANNENBERG et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

Foram identificadas diferentes classes de substâncias nos resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa, com destaque para compostos fenólicos como o ácido gálico, galotaninos e flavonoides nos extratos polares. É possível que essas substâncias estejam relacionadas com a maior atividade antibacteriana apresentada por esses extratos. As frações apolares tiveram triterpenos como principais constituintes. No extrato diclorometânico, além do schinol e do ácido masticadienoico, outros nove íons tiveram fórmulas moleculares associadas a triterpenos ácidos indicando a presença de substâncias que ainda não foram isoladas dessa planta.

Este trabalho relata a influência do solvente extrator na formação e, consequentemente, na identificação dos galatos de metila e etila e descreve pela primeira vez a ocorrência da quercitrina *O*-galato na espécie. Os extratos ricos em substâncias fenólicas apresentaram significativa atividade contra bactérias multirresistentes de origem hospitalar, principalmente frente à *S. aureus* resistente à meticilina e *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina.

Devido à riqueza de compostos fenólicos os resíduos da indústria de beneficiamento de pimenta rosa podem ser utilizados como fonte de substâncias com potencial antioxidante, antimicrobiano além da aplicação como conservante de alimentos, sendo necessário mais estudos sobre o aproveitamento desse material. Essas descobertas fornecem oportunidades para explorarmos a utilização de subprodutos industriais visando a redução dos fluxos de resíduos e a recuperação de compostos bioativos.

6. REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chem.*, **166**, 179–191, 2015.

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream, Illinois, 648 p. 2009.

ALSEEKH, S.; FERNIE, A. R. Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? *Plant J.*, **94**, 933–942, 2018.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. 2017

ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**, 1. ed, 2011. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf> Acesso em 04 de maio de 2017.

ARRAIS, L.G. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana e farmacológica de *Croton pulegioides* Baill (*Euphorbiaceae*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012. 110 p.

ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomed. J Chromatogr.*, **19**, 586–605, 2005.

BARBIERI, D.S.V et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, **59**, 887–896, 2014.

BATISTA, Lilian C.S.O. et al. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. *Parasitology*, **143**, 627–638, 2016.

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, JP.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *J. Food Sci.* **75**, 466-472. 2010.

BERNARDES, N.R., HEGGDORNE-ARAÚJO, M., BORGES, I.F.J.C., ALMEIDA, F.M., AMARAL, E.P., LASUNSKAIA, E.B., MUZITANO, M.F., OLIVEIRA, D.B. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Brazilian J. Pharmacogn.*, **24**, 644–650. 2014.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 396–402, 2007.

CAI, Y., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, **74**, 2157–2184. 2004.

CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). *Ind. Crops Prod.*, **116**, 81–89, 2018

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **15**, 158-169, 2013.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 731–742, 2012.

CAVALHER-MACHADO, S. C. et al.; The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int. Immunopharmacol.*, **8**, 1552–1560. 2008.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FAVERO, A. O.; LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim. Nova*, **30**, 597-599, 2007.

CHEMISTRY WEBBOOK <https://webbook.nist.gov/chemistry/>

COLE, E. R. 2008. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao Dengue.** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

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

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae, *Quim. Nova*, **29**, n. 6, 1287-1300, 2006.

COSGROVE, Sara E. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clinical Infectious Diseases*, Suppl 2, 82–89, 2006.

COSTA, E.M.M.B; EVANGELISTA, A.P.A; MEDEIROS A.C.D.; DAMETTO, F.R.; CARVALHO, R.A. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action. *Braz. Oral Res.*, **26**, 215-21, 2012.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quím. Nova*, **29**, 287-292, 2006.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **38**, 99–107, 2011.

DA SILVA DANNENBERG, G. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **36**, 120–127, 2016.

DA SILVA, J. H. S. et al. Anti- *Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. *Nat. Prod. Res.*, 1–4, 2017.

DA SILVA, M. M. et al. *Schinus terebinthifolius*: Phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **27**, 445–452, 2017.

DE KRAKER, M. E. A. et al. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. *PLoS Med*, **8**, 2011.

DE SOUZA, J.R.B., DIAS, F.F.G., CALIMAN, J.D., AUGUSTO, F., HANTAO, L.W. Opportunities for green microextractions in comprehensive two-dimensional gas chromatography / mass spectrometry-based metabolomics – A review. *Anal. Chim. Acta*, **1040**, 1–18, 2018.

DECORTE, B. L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. *J. Med. Chem.*, **59**, 9295–9304, 2016.

DEGÁSPARI, C. H.; WASCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciênc. Agrotec.*, **29**, 617-622, 2005.

DEWICK, P. M.; **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach, John Wiley & Sons: New York, 2009.

DUARTE, M.R.; TOLEDO, M.G.; OLIVEIRA, R.B. Diagnose morfoanatômica de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi, Anacardiaceae). *Visão Acadêmica* (Impresso), Curitiba, **7**, 1- 14, 2006.

EL-MASSRY, KF; EL-GHORAB, AH; SHAABAN, HA; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J Agric Food Chem.*, **57**, 5265–5270, 2009.

ELSHAFIE, H. S., GHANNEY, N., MANG, S. M., FERCHICHI, A.; CAMELE, I. An *In Vitro* Attempt for Controlling Severe Phytopathogens and Human Pathogens Using Essential Oils from Mediterranean Plants of Genus *Schinus*. *Journal of Medicinal Food*, **19**, 266–273. 2016.

ENGELS, C.; GÄNZLE, M. G; SCHIEBER, A. Fast LC – MS analysis of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels and effects of methanolysis on their antibacterial activity and iron binding capacity. *Food Research International*, **45**, 422–426, 2012.

ENNIGROU, A. et al. Assessing the fatty acid, essential oil composition, their radical scavenging and antibacterial activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves and twigs. *J. Food Sci. Technol.*, 2018.

ENNIGROU, A. et al. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. *South African Journal of Botany*, **108**, 407–415, 2017.

FARHADI, F., KHAMENEH, B., IRANSHAHI, M., IRANSHAHI, M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 1–28, 2018.

FEUEREISEN, M. M. et al. Characterization of phenolic compounds in brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 6219–6226, 2014.

FEUEREISEN, M. M. et al. Differentiation of Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and Peruvian Peppertree (*Schinus molle* L.) Fruits by UHPLC-UV-MS Analysis of Their Anthocyanin and Biflavonoid Profiles. *J. Agric. Food Chem.*, **65**, 5330–5338, 2017.

GEIGER, J. H. ; PRATT, P. D.; WHEELER, G.; WILLIAMS, D. A. Hybrid vigor for the invasive exotic Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi., Anacardiaceae) in Florida. *Int. J. Plant Sci.* **172**, 655–663, 2011.

GHASTE, M., MISTRIK, R., SHULAEV, V. Applications of fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) and orbitrap based high resolution mass spectrometry in metabolomics and lipidomics. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 2016.

GOMES, F.S., PROCÓPIO, T.F., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C., PAIVA, P.M. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 672–679, 2013.

GUERRA, M.J.M.; BARREIRO, M.L.; RODRIGUEZ, Z.M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extracto fluído al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Ver. Cubana Plant. Med.* **5**(1), 23-5, 2000.

GUFFANTI, P., PIFFERI, V., FALCIOLA, L., FERRANTE, V. Analyses of odours from concentrated animal feeding operations: A review. *Atmospheric Environment*, **175**, 100–108, 2018.

HERNÁNDEZ, F., PORTOLÉS, T., PITARCH, E., LÓPEZ, F.J. Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology. *Trends Anal. Chem.*, **30**, 388–400, 2011.

HOFFMANN, E; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3° Ed. London, John Wiley & Sons, 2007.

INCAPER. Aroeira: um nicho de mercado em expansão na economia capixaba. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/Not%C3%ADcia/aroeira-um-nicho-de-mercado-em-expansao-na-economia-capixaba>. Acesso em: Março/2017

JAIN M.K., B.Z. YU, J.M. ROGERS, A.E. SMITH, E.T.A. BOGER, R.L. OSTRANDER; A.L. RHEINGOLD. *Phytochemistry* **39**, 537-547, 1995.

JAIN, M. K. et al. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, **39**, 537–547, 1995.

JIMÉNEZ, A.; MECKES, M.; ALVAREZ, V.; TORRES, J.; PARRA, R. Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (*Palmae*) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother. Res.* **19**, 320–322. 2005.

JIMÉNEZ-ARELLANES, A.; LUNA-HERRERA, J.; CORNEJO-GARRIDO, J.; LÓPEZ-GARCIA, S.; CASTRO-MUSSOT, M.E.; MECKES-FISHER, M.; MATA-ESPINOSA, D.; MARQUINA, B.; TORRES, J.; HERNÁNDEZ-PANDO, R. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**, 258–269, 2013.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A. R. S.; CISALPINO, P. S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M. A.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **9**, 30. 2010.

KANG, Mi-Sun et al. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *The Journal of Microbiology*, **46**, 744–750, 2008.

KANGSAMAKSIN, T. et al. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- α . *PLoS One*, **12**, 1–17, 2017.

KARYGIANNI, L., CECERE, M., SKALTSOUNIS, A.L., ARGYROPOULOU, A., HELLWIG, E., ALIGIANNIS, N., WITTMER, A., AL-AHMAD, A. High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. *BioMed Research International*, 2014.

KIM, S.G.; KIM, M.J.; JIN, D.; PARK, S.N.; CHO, E.; FREIRE, M.O.; JANG, S.J.; PARK, Y.J.; KOOK, J.K. Antimicrobial effect of ursolic acid and oleanolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Microbiol.* **48**, 212–215, 2012.

KOŁODZIEJCZYK, Krzysztof et al. Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Ind. Crops Prod.*, **51**, 279–288, 2013.

LI, D.X., GAN, L., BRONJA, A., SCHMITZ, O.J. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Anal. Chim. Acta*, **891**, 43–61, 2015.

LIMA, L. B.; VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; LEITE, V. R.; FERREIRA, P. A.; ANDRADE, B. A.; ARAÚJO, E. L.; XAVIER, H. S.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **126**, 468-73, 2009.

LIMA, M. R. F. *et al.*; Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **105**, 137-47, 2006.

LIMBERGER, R. P. *et al.* Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quim. Nova*, **27**, 916-919, 2004.

LLOYD, H.A., JAOUNI, T.M., EVANS, S.L., MORTON, J.F., Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, **16**, 1301-1302, 1977.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. v.1. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia)**. 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017**. Brasília. 2017. 210 p.

MOELLERING, R.C. MRSA: the first half century. *J. Antimicrob Chemother.*, **67**, 4–11, 2012.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quim. Nova*, **24**, 105-111, 2001.

MORAIS, Thiago R. *et al.* Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/activity relationships. *Molecules*, **19**, 5761–5776, 2014.

MORTON, J.F. Brazilian pepper - Its impact on people, animals and the environment *Econ. Bot.* **32**, 353–359, 1978.

MUHS, A.; LYLES J. T.; PARLET, C. P.; NELSON, K.; KAVANAUGH, J. S.; HORSWILL, A. R.; QUAVE, C. L. Virulence Inhibitors from Brazilian Peppertree Block Quorum Sensing and Abate Dermonecrosis in Skin Infection Models. *Sci. Rep.*, **7**, 1-15, 2017.

MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical microbiology reviews*, **3**, 46-65, 1990.

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *The New England Journal of Medicine*, **342**, 710-721, 2000.

NEVES, E. J. M; SANTOS, A. M; GOMES, J. B. V; RUAS, F. G; VENTURA, J. A. Cultivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para produção de pimenta- rosa. Colombo: Embrapa Florestas, 2016. 10p. (Documentos, 294).

NICHOL, D.; JEAVONS, P.; FLETCHER, A. G.; BONOMO, R. A.; MAINIP, P. K.; PAUL, J. L.; GATENBY, R. A.; ANDERSON, A. R. A.; SCOTT, J. G. Steering Evolution with Sequential Therapy to Prevent the Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance. *PLoS Comput. Biol.*, **11**, 1–19, 2015.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, **10**, 189–197, 2008

PRATTI, D. L. A.; RAMOS A. C.; SCHERER, R.; CRUZ, Z. M. A; SILVA A. G. Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian pepper tree, *Schinus terebinthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. *Parasites & Vectors*, **8**, 1-10, 2015.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, **109**, 309–318, 2016.

PROCÓPIO, T. F.; FERNANDES, K. M.; PONTUAL, E. V.; XIMENES, R. M.; DE OLIVEIRA, A. R.; SOUZA, C.; MELO, A. M.; NAVARRO, D. M.; PAIVA, P. M.; MARTINS, G. F.; NAPOLEÃO, T. H. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* Larvae. *Plos One*, **10**, 1-19, 2015.

RAHMAN, M. et al. Prevalence and Molecular Characterization of New Delhi Metallo-Beta-Lactamases in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from India. *Microbial Drug Resistance*, **24**, 792–798, 2018.

ROCHA, P.S. et al. Antioxidant and Protective Effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi Against Doxorubicin-Induced Toxicity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **184**, 869–884, 2017.

ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 201 p.

ROSAS, E. C. et al.; Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, **175**, 490–498, 2015.

RUAS, F.G. **Seleção de genótipos, manejo e perfil químico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.) no estado do Espírito Santo**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012. 141 p.

SALEEM, Mohammad et al. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*, **23**, 5203–5214, 2004.

SALMINEN, A. et al. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2979– 2999, 2008.

SÁNCHEZ-MONROY, M. et al. Masticadienonic and 3 α -OH Masticadienoic Acids Induce Apoptosis and Inhibit Cell Proliferation and Tumor Growth in Prostate Cancer Xenografts in Vivo. *Molecules*, **22**, 1479, 2017.

SANTANA, J. S.; SARTORELLI, P.; LAGO J. H. G. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim. Nova*, **35**, 2245-2248, 2012.

SCHEID, T., MORAES, M.S., HENRIQUES, T.P., PAULA, A., RIFFEL, 656 K., BELLÓ-KLEIN, A., POSER, G.L. VON, ETHUR, E.M., PARTATA, W.A. Effects of Methanol Fraction from Leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on Nociception and Spinal-Cord Oxidative Biomarkers in Rats with Neuropathic Pain. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 1-11, 2018.

SCHIMITBERGER, V. M. B. et al. Volatile compounds profile changes from unripe to ripe fruits of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolia* Raddi). *Ind. Crops Prod.*, **119**, 125–131, 2018.

SCHULZE-KAYSERS, N.; FEUEREISEN, M. M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds in edible species of the Anacardiaceae family – a review. *RSC Advances*, **5**, 73301–73314, 2015.

SILVA, D. Produtores de pimenta-rosa do ES investem no mercado externo. De A Gazeta. 2017. Disponível em: <<http://g1.globo.com/espirito-santo/agronegocios/noticia/2017/03/produtores-de-pimenta-rosa-do-es-investem-no-mercado-externo.html>> Acesso em 05 de julho de 2017.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. 2015. Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4401>> Acesso em 18 de setembro de 2017.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

STERN, B. et al. Compositional variations in aged and heated *Pistacia* resin found in late bronze age canaanite amphorae and bowls from Amarna, Egypt. *Archaeometry*, **45**, 457–469, 2003.

THE PHEROBASE-DATABASE, 2018 - The Pherobase-Database of pheromones and semiochemicals <http://www.pherobase.com/>

TLILI, N., YAHIA, Y., FERIANI, A., LABIDI, A., GHAZOUANI, L., NASRI, N., SAADAOU, E., KHALDI, A. *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: A comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. *Ind. Crops Prod.*, **122**, 559–565, 2018.

TONIAL, F. et al. Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Curr. Microbiol.*, **72**, 173–183, 2016.

ULIANA, M. P.; FRONZA, M.; SILVA, A. G.; VARGAS, T. S.; ANDRADE, T. U.; SCHERER, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind. Crops Prod.*, **83**, 235–240, 2016.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, **29**, 326–337, 2006.

VIEIRA, M. N. et al. *Schinus terebinthifolius* scale-up countercurrent chromatography (Part I): HIGH performance countercurrent chromatography fractionation of triterpene acids with off-line detection using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1389**, 39–48, 2015.

VUORINEN, A. et al. *Pistacia lentiscus* oleoresin: Virtual screening and identification of masticadienonic and isomasticadienonic acids as inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Planta Med.*, **81**, 525–532, 2015.

WHO - World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf> Acesso em: 13 de junho de 2017.

WHO - Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Geneva: World Health Organization; 2017b. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259744/9789241513449-eng.pdf>> Acesso em: 15 de março de 2018.

ZHENG, GQ; KENNEY, PM; LAM, LKT. Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia caryophyllata*) as Potential Anticarcinogenic Agents. *Nat. Prod*, **55**, 999-1003, 1992.