



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

RODRIGO MORAES

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIFÚNGICA DE CLONES DE *Schinus terebinthifolia* Raddi.**

Vitória, ES
2023

Rodrigo Moraes

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIFÚNGICA DE CLONES DE *Schinus terebinthifolia* Raddi.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

Vitória, ES
2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M827a Moraes, Rodrigo, 1981-
Análise da composição química e da atividade antibacteriana
e antifúngica de clones de *Schinus terebinthifolia* Raddi. /
Rodrigo Moraes. - 2023.
82 f. : il.

Orientador: José Aires Ventura.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Aroeira. 2. Fitoquímicos. 3. Espectrometria. 4.
Cromatografia. 5. Agentes infecciosos. 6. Antibiótico. I.
Ventura, José Aires. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 18ª sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente RODRIGO MORAES, realizada às 13:30h do dia primeiro de março de dois mil e vinte e três (01/03/2023), na sala de Webconferência do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, tese intitulada "ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DE CLONES DE *Schinus terebinthifolia*". A sessão pública foi realizada em formato virtual, com transmissão por meio de videoconferência (<https://meet.jit.si/pgbiotecologiaufes>). O presidente da Banca, Prof. Dr. José Aires Ventura (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos, da Universidade Federal do Espírito Santo, como membro titular interno, Profª. Drª. Denise Coutinho Endringer, da Universidade de Vila Velha, como membro titular externo; Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster, da Universidade Federal do Espírito Santo, como membro titular externo ao Programa; Prof. Dr. Hildegardo Seibert França, do Instituto Federal do Espírito Santo (Campus Vila Velha), como membro titular externo; e passou a palavra para o aluno que apresentou a sua proposta de Tese. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o doutorando **APROVADO** na defesa de Doutorado. Eu, José Aires Ventura, que presidi a Banca de defesa, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Vitória, 01 de março de 2023.

Prof. Dr. José Aires Ventura – Orientador
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos – Membro interno
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª. Drª. Denise Coutinho Endringer – Membro externo
Universidade Vila Velha

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster – Membro externo
Universidade Federal do Espírito Santo

Documento assinado digitalmente
DENISE COUTINHO ENDRINGER
Data: 06/03/2023 14:47:50-0900
Verifique em <https://verificador.br.br>

Prof. Dr. Hildegardo Seibert França – Membro externo
Instituto Federal do Espírito Santo (Campus Vila Velha)

Documento assinado digitalmente
HILDEGARDO SEIBERT FRANÇA
Data: 07/03/2023 14:22:08-0900
Verifique em <https://verificador.br.br>

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/06/2018, por
JOSE AIRES VENTURA - PROFESSOR VOLUNTARIO
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPOB/OCS
Em 03/03/2023 às 10:00

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/001040?tipoArquivo=0>

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.268 de 30/06/2018, por
ALEXANDRE MARTINS COSTA SANTOS - SIAPE 1066543
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCF/OCS
Em 06/03/2023 às 13:28

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/062207?tipoArquivo=0>

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.268 de 30/06/2018, por
RICARDO MACHADO KUSTER - SIAPE 1213734
Departamento de Química - DQ/OCS
Em 07/03/2023 às 08:00

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/002070?tipoArquivo=0>

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado até aqui.

À minha esposa, Flávia, e meus filhos, Valentina, Bento e Dante, por, na medida do possível, terem compreendido a minha ausência. Eles são a minha fonte de inspiração e motivação. É por vocês!

À minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio, motivação e orações.

Agradeço imensamente a possibilidade e a honra de ser orientado pelo Dr. José Aires Ventura. A cada reunião um novo aprendizado! Obrigado por ressignificar em mim o conceito de “orientação” e demonstrar a importância da compreensão!

Ao Prof. Alexandre Martins Costa Santos e Prof. Ricardo Machado Kuster pelas sugestões no decorrer do trabalho e em especial na apresentação da Qualificação. Parabéns por conseguirem unir competência, conhecimento técnico e simpatia.

À Prof^a Denise Coutinho Endringer e Prof. Hildegardo Seibert França pela disponibilidade e atenção ao atender o convite de participar da Banca Avaliadora deste trabalho. A participação de vocês valoriza ainda mais esta etapa!

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em especial aos Professores, Coordenadoras e Funcionárias do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia por possibilitarem o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa e por me oportunizar conhecer novas formas de se fazer Ciência.

À Prof^a, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Adriana Madeira Alvares da Silva. Obrigado por colaborar na minha formação científica, mas sobretudo pela sua pedagogia e métodos altruísta, beneficente e justo.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia aplicada ao Agronegócio da UFES e ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), em especial ao Prof. Alexandre Martins Costa Santos, Monique e Aurélio pela colaboração na realização dos experimentos de cromatografia e liofilização.

Ao INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), pelo apoio e pelo fornecimento dos frutos de aroeira utilizados neste trabalho.

À Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM) pelo apoio incondicional no decorrer de todo este estudo, em especial

pela disponibilização de estruturas e equipamentos. O apoio à pesquisa sempre será diretamente proporcional à grandeza das instituições de ensino.

Aos colegas da Emescam, em especial à Prof^a Norma Lucia Santos Raymundo e Prof. Afrânio Cogo Destefani, à Prof^a Priscila Pinto e Silva dos Santos, Prof. Adelson Luiz Ferreira, Prof^a Marcela Souza Lima Paulo, aos técnicos Rosecleia Marcos de Oliveira, Sara de Oliveira Mota, Sinval Paiva, Vera Lúcia Arruda de Oliveira e em especial ao Magno Pinheiro Gomes, meu companheiro de todas as horas na realização de experimentos.

Aos profissionais do Laboratório de Petroleômica e Forense da UFES, Prof^o Wanderson Romão, à Larissa e Amanda, pelo apoio na realização das análises de Espectrometria de Massas.

Aos profissionais do Laboratório de Cromatografia da LabPetro, UFES, em especial ao Dr. Bruno Quirino, pelo apoio na realização das análises de identificação molecular por CG-EM.

À Farmacêutica, Mestre em Doenças Infecciosas, Erica Santana de Souza pelo apoio na realização dos testes de susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos.

À Dra Maria Diana Cerqueira Sales, fonte de inspiração para o início deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

A aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) está inserida na Relação Brasileira de Medicamentos Essenciais em função do seu potencial para gerar biocompostos incluindo aqueles com propriedade antimicrobiana. A ocorrência de resistência aos antimicrobianos aumenta os custos de saúde, tempo de permanência em hospitais, morbidade e mortalidade. A OMS publicou uma lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos na tentativa de orientar e promover a pesquisa, desenvolvimento e Inovação de novos antibióticos incluindo aqueles que possam combater o *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase. Fungos do gênero *Fusarium* são importantes patógenos para plantas, humanos e animais, além de produtores de micotoxinas em alimentos, havendo uma grande carência de novas moléculas que possam ser usadas para o seu controle. Esta pesquisa buscou caracterizar o perfil fitoquímico de extratos polares e apolares de frutos maduros de quatro clones de aroeira e a atividade antimicrobiana para bactérias *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e o fungo *Fusarium guttiforme*. Os extratos de todos os clones de aroeira mostraram atividade antimicrobiana para as bactérias e fungo, variando em função do clone e solvente utilizado. Os extratos polares apresentaram maior atividade antifúngica e antibacteriana, sendo mais ativos em bactérias Gram positivas. A atividade antifúngica e antibacteriana variou em função do clone avaliado. O clone BAAr 5 apresentou maior atividade antibacteriana enquanto os clones BAAr 5 e BAAr 8 maior atividade antifúngica. Os clones de aroeira apresentaram similaridade no perfil cromatográfico por CLAD. Foi possível observar maior quantidade relativa de picos no clone BAAr 5 quando extraído por meio do solvente hidroetanólico. O cromatograma dos extratos hexânicos apresentou maior diversidade de picos. Houve maior abundância de sesquiterpenos comparado aos monoterpenos quando as amostras foram avaliadas em CG-EM. A espectrometria por meio de ESI(-)FT-ICR MS identificou a presença de 29 íons, compreendidos entre os m/z 195 e m/z 925 nos extratos polares dos clones. Vinte e quatro íons foram observados no clone BAAr 5, 20 no clone BAAr 8, 23 no clone BAAr9 e 17 no clone BAAr 23. Apesar dos clones terem sido cultivados sob as mesmas condições edafoclimáticas, apresentaram variação na atividade antimicrobiana e de compostos bioativos identificados. Sugere-se que o uso comercial da aroeira deve ser proveniente de plantas selecionadas e clonadas que apresentem as características desejadas.

Palavras-chave: Aroeira, Antimicrobiano, Fitoquímico, Espectrometria, Cromatografia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais constituintes químicos voláteis, estruturas químicas e valores médios encontrados em frutos de <i>Schinus terebinthifolia</i>	17
Figura 2 - Composição de terpenos nas folhas e frutos (verde, imaturo e maduro) de <i>S. terebinthifolia</i>	20
Figura 3 - Principais componentes fenólicos voláteis presentes em três diferentes genótipos (BAAr 5, BAAr 8, BAAr 23) de <i>S. terebinthifolia</i> utilizados neste estudo.....	21
Figura 4 - Amostra de frutos de aroeira, clone BAAr 8, triturados com grau e pistilo de porcelana (A). Extração por meio do uso de solvente hexano em duas amostras de frutos de aroeira (B).....	32
Figura 5 – Secagem das amostras por meio do uso de Evaporador rotativo (Fisatom® 802) acoplado a bomba de vácuo (GS® VAC30) e banho-maria (Fanem® 1102)	33
Figura 6 – Representação esquemática do experimento de microdiluição em caldo de uma amostra de extrato vegetal com 4 bactérias.....	35
Figura 7 – Leitura do experimento de microdiluição em caldo para verificação da MIC de uma amostra de extrato vegetal com 4 bactérias (2 ORSA e 2 KPC).....	36
Figura 8 – Cromatógrafo gasoso acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS). Modelo GC 2010 Plus/GCMS - QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan.....	40
Figura 9 - Espectrômetro de Massas de Ressonância Ciclôtrônica de Íons com Transformada de Fourier (ESI (-) FT - ICR MS). Modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha.....	41
Figura 10 – Mediana da MIC (concentração inibitória mínima) dos extratos hexânicos (Hex) e hidroetanólicos (HidrEt) extraídos dos clones BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9 e BAAr 23 para as bactérias ORSA e KPC.....	44
Figura 11 – Mediana da MBC (concentração bactericida mínima) dos extratos hexânicos (Hex) e hidroetanólicos (HidrEt) extraídos dos clones BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9 e BAAr 23 para as bactérias ORSA e KPC.....	45
Figura 12 – Avaliação da atividade antifúngica de diferentes concentrações dos extratos hidrofílicos de clones de <i>S. terebinthifolia</i> (BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9 e BAAr 23) para o fungo <i>F. guttiforme</i>	49
Figura 13 - Diâmetros das culturas de <i>F. guttiforme</i> cultivadas em meios suplementados com extratos hidroetanólicos de clones de aroeira.....	50
Figura 14 - Média em mm do Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PMGI) de <i>F. guttiforme</i> por extratos hidroetanólicos de clones de aroeira	52

Figura 15 - Efeito inibitório no desenvolvimento de <i>F. guttiforme</i> de extratos hexânico e hidroetanólicos (200 mg mL ⁻¹) e Itraconazol (5 µg mL ⁻¹) para clones de aroeira.....	56
Figura 16– Perfil cromatográfico das amostras BAAr 5 (preto), BAAr 23 (marrom), BAAr 8 (rosa), BAAr 9 (azul) extraídos com o solvente hidroetanol.....	57
Figura 17– Perfil cromatográfico das amostras BAAr 5 (preto), BAAr 23 (marrom), BAAr 8 (rosa), BAAr 9 (azul) extraídos com o solvente hexano. (µV=microvolt). (A) Perfis agrupados. (B) Perfis desagrupados.....	58
Figura 18 - Perfil cromatográfico por GC-MS para extratos hexânicos de quatro clones de <i>S. terebinthifolia</i> (BAAr 5; BAAr 8; BAAr 9; BAAr 23)	60
Figura 19 – ESI(-)FT-ICR MS para extrato hidroetanólico de clones de aroeira (BAAr 5=B5; BAAr 8=B8; BAAr 9=B9; BAAr 23=B23).....	62
Figura 20 - Número de íons observados por ESI(-)FT-ICR MS em extratos hidroetanólicos de clones de aroeira.....	64
Figura 21 – Estrutura química da miricitrina.....	66
Figura 22 - Estrutura química do pentagaloilglicose (5 galoil periférico e uma glicose central)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos químicos isolados em <i>Schinus terebinthifolia</i> que apresentaram atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	16
Tabela 2 - Perfil químico <i>S. terebinthifolia</i> obtidos em diferentes países.....	18
Tabela 3 - Composição de terpenos nas folhas e frutos de <i>S. terebinthifolia</i>	20
Tabela 4 - Comparação entre os valores da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de extratos hexânicos e hidroetanólicos em bactérias ORSA e KPC.....	42
Tabela 5 - MIC e MBC dos extratos hexânicos e hidroetanólicos para bactérias ORSA e KPC.....	44
Tabela 6 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) de extratos hexânicos (Hex) e hidroetanólicos (HidrEt) dos frutos de quatro diferentes quimiotipos de <i>S. terebinthifolia</i>	46
Tabela 7 – Média dos diâmetros (mm) das culturas de <i>F. guttiforme</i> cultivadas em meios suplementados com extratos hidroetanólicos de clones de aroeira.....	50
Tabela 8 – MIC e MFC de extratos hidroetanólicos de clones de aroeira para <i>F. guttiforme</i>	51
Tabela 9 - Média em mm do Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PMGI) de <i>F. guttiforme</i> por extratos hidroetanólicos de clones de aroeira.....	51
Tabela 10 – Efeito inibitório de extratos hidroetanólicos de clones de aroeira em <i>F. guttiforme</i>	53
Tabela 11 – Efeito inibitório no desenvolvimento de <i>F. guttiforme</i> de extratos hexânico e hidroetanólicos para clones de aroeira.....	56
Tabela 12 - Substâncias propostas a partir dos dados ESI(-)FT-ICR MS para os extratos hidroetanólicos dos clones BAAr 5, BAAr 8, BAAr9 e BAAr 23.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BAAr - Banco Ativo de Aroeira

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

DBE - *Double bound equivalente*

DC – Diâmetro do controle de crescimento

DMSO - Dimetilsulfóxido

DT – Diâmetro final do teste

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ESI(-)FT-ICR MS - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray e ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HidrEt – Hidroetanólico

CLAD - Cromatografia líquida de alto desempenho

HS-GC-MS Headspace associada à cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massa

KPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase

LPS – Lipopolissacarídeo

m/z – mass-to-charge ratio (Razão massa/carga)

MBC - Concentração bactericida mínima

MFC – Concentração fungicida mínima

MHb - Caldo Mueller-Hinton

MIC - Concentração inibitória mínima

mmHg – Milímetros de mercúrio

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

NIST - National Institute of Standards and Technology

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORSA - *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

P, D & I - Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

p/v – Proporção de peso por volume

PBP - Proteína de ligação à penicilina

PMGI - Percentagem de inibição do crescimento micelial

RPM - Rotações por minuto

v/v – Proporção de volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA HUMANA.....	22
1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina/oxacilina (MRSA/ORSA)	23
1.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de Carbapenemase (KPC).....	26
1.2. FUSARIOSE DO ABACAXI.....	28
1.2.1 Biocontrole de fitopatógenos.....	29
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	31
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO A PARTIR DE FRUTOS <i>S. terebinthifolia</i>	31
3.2.1 Extração hexânica (apolar) e hidroalcolólica (polar).....	31
3.2.2 Secagem das amostras em evaporador rotativo.....	32
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AROEIRA EM AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i> RESISTENTE À OXACILINA (ORSA) e <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTOR DE CARBAPENEMASE (KPC).....	33
3.3.1 Linhagens dos microrganismos.....	33
3.3.2 Teste de microdiluição em caldo.....	34
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CLONES DE AROEIRA EM <i>Fusarium guttiforme</i>	36
3.4.1 Microrganismo.....	36

3.4.2 Efeito inibitório <i>in vitro</i> de extratos hidroetanólicos de aroeira no crescimento micelial de <i>Fusarium guttiforme</i> -Técnica de Pour Plate	37
3.4.3 Efeitos no desenvolvimento de <i>Fusarium guttiforme</i> de extratos hidroetanólicos e hexânicos de aroeira – (Dispersão em superfície).....	38
3.5 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (CLAD).....	38
3.6 PERFIL QUÍMICO POR CG-EM DE EXTRATOS HEXÂNICOS DE FRUTOS MADUROS DE QUATRO CLONES DE AROEIRA.....	39
3.6.1 Derivatização das amostras.....	39
3.6.2 Análise por CG-EM de amostras metiladas.....	39
3.7 PERFIL QUÍMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E RESSONÂNCIA CICLOTRÔNICA DE ÍONS COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ESI(-)FT-ICR MS).....	40
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AROEIRA EM AMOSTRAS DE ORSA e KPC.....	42
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CLONES DE AROEIRA EM <i>Fusarium guttiforme</i>	49
4.2.1 Inibição <i>in vitro</i> de extratos hidroetanólicos de aroeira no crescimento micelial de <i>Fusarium guttiforme</i> – Técnica de Pour Plate.....	49
4.2.2 Efeito de extratos hidroetanólicos e hexânicos de aroeira no desenvolvimento de <i>Fusarium guttiforme</i>	55
4.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (CLAD).....	57
4.3.1 Avaliação cromatográfica dos extratos hidroetanólicos (polares).....	57
4.3.2 Avaliação cromatográfica dos extratos hexânicos (apolares).....	57

4.4 PERFIL QUÍMICO POR CG-EM DE EXTRATOS HEXÂNICOS DE CLONES DE AROEIRA.....	59
4.5 PERFIL QUÍMICO POR ESI(-)FT-ICR MS DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE CLONES DE AROEIRA.....	61
5 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) também conhecida como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta brasileira, baga de Natal e pimenta rosa, pertencente à família Anacardiaceae (PIRAS, *et al.*, 2017a). Tem flores pequenas e os seus frutos são drupas verdes quando imaturas, que se tornam vermelhos quando maduros, com uma semente marrom escura por fruto e cujo cheiro se assemelha ao da manga verde (KWEKA, *et al.* 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A espécie *S. terebinthifolia* está inserida entre as 71 plantas medicinais da Relação Brasileira de Medicamentos Essenciais (RENISUS) que apresentam potencial para gerar produtos de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Isso se deve às muitas propriedades medicinais atribuídas à aroeira, como propriedades adstringentes, antidiarreicas, depurativas, curativas e cicatrizantes, diuréticas e febrífugas e suas atividades biológicas como anti-hipertensivo e vasodilatador, antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, anti-inflamatório e antioxidante conferidas aos seus frutos e óleos essenciais (COUTINHO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolia* pode ser atribuída a um possível efeito sinérgico entre compostos secundários minoritários extraídos de partes da planta (NGUEFACK *et al.*, 2012), ou à ação isolada de alguns componentes como β -mirceno, β -cubebeno e limoneno, que são antibacterianos conhecidos (BURT, 2004). Individualmente, diversos compostos extraídos de aroeira vermelha já tiveram a sua capacidade antimicrobiana comprovada para espécies de bactérias, fungos e vírus (Tabela 1).

Tabela 1 – Compostos químicos isolados em *Schinus terebinthifolia* que apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro*.

Composto	Atividade	Referência
α-pineno e β-pineno	Antibacteriano (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina - MRSA)	RIVAS <i>et al.</i> , 2012.
	Antifúngico (<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Rhizopus oryzae</i>)	
α-felandreno	Antibacteriano e antifúngico.	ISCAN <i>et al.</i> , 2012.
δ-cadineno	Antibacteriano (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	PÉREZ-LOPES <i>et al.</i> , 2011
Catequina	Antimicrobiano e antiviral (Herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1))	MUSARRA-PIZZO <i>et al.</i> , 2019.
	Antibacteriano, antifúngico	COSARCĂ <i>et al.</i> , 2019.
	Antimicrobiano, antiviral	BAE <i>et al.</i> , 2020.
	Antiviral (Influenza A (H1N1))	YOU <i>et al.</i> , 2018.
Ácido cumárico	Antimicrobiano	BOO, 2019.
	Antimicrobiano	PEI <i>et al.</i> , 2015.
Epicatequina	Antiviral (Vírus Mayaro (MAYV))	FERREIRA <i>et al.</i> , 2018.
	Antibacteriano	EZHIL; LAKSHMI, 2017.
	Antimicrobiano	PRAKASH <i>et al.</i> , 2019.
Ácido gálico	Antimicrobiano e antiviral (HSV-1 e Vírus PI-3)	OZCELIK <i>et al.</i> , 2010.
	Antiviral (Influenza A e B).	LEE <i>et al.</i> , 2016
Mirceno	Antibacteriano (anti- <i>Staphylococcus</i>)	INOUE <i>et al.</i> , 2004.
Ácido morônico	Anti-Herpes Simplex Virus	KUROKAWA <i>et al.</i> , 1999.
	Antibacteriano	HOSTETTMANN-KALDAS; NAKANISHI, 1979.
	Inibição do Epstein–Barr virus.	CHANG <i>et al.</i> , 2010.
	Anti-HIV	ITO <i>et al.</i> , 2001
Pentagaloil glicose (tanino)	Antibacteriano (<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos)	DETTWEILER <i>et al.</i> , 2020.
Pentagaloil glicose (tanino)	Antimicrobiano, antiviral	TORRES-LEÓN <i>et al.</i> , 2017
Resveratrol	Antifúngico e anti- <i>Staphylococcus</i>	DWIBEDI e SAXENA, 2019.
	Antiviral (MERS-CoV)	LIN <i>et al.</i> , 2017.
	Antiviral (Zika virus (ZIKV))	MOHD <i>et al.</i> , 2019.

Extratos derivados de amostras de aroeira, coletadas em diferentes regiões do globo, têm mostrado resultados qualitativos e quantitativos distintos nas análises de CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas), com a prevalência de alguns desses compostos químicos (Figura 1) e destaque para os monoterpenos.

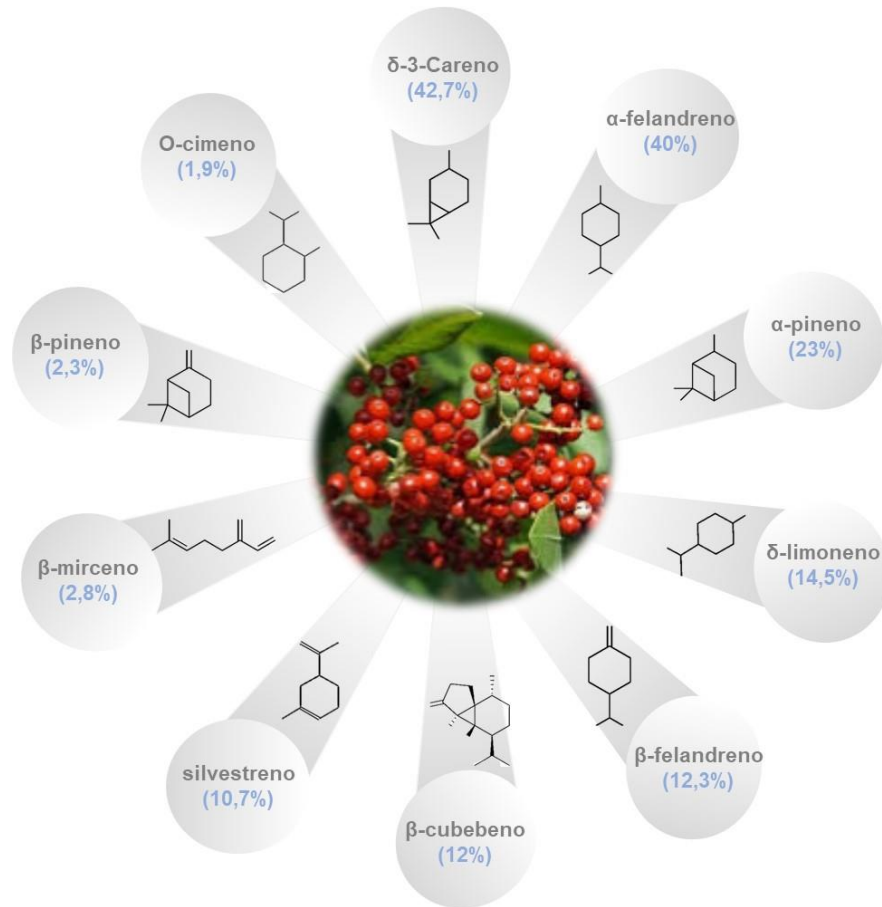


Figura 1 - Principais constituintes químicos voláteis, estruturas químicas e valores médios encontrados em frutos de *Schinus terebinthifolia*. Adaptado de: Cole *et al.*, (2014); Dannenberg *et al.*, (2019); Elshafie *et al.*, (2016); Ennigrou *et al.*, (2017); Gomes *et al.*, (2020); Piras *et al.*, (2017); Pratti *et al.*, (2015); PubChem, (2022).

A concentração dos compostos pode variar em função do órgão coletado para análise (fruto ou folha) e estágio de maturação dos frutos (VERNIN; PARKANYI, 2003), ou o local de produção (Figura 2; Tabela 2; Tabela 3).

Tabela 2 – Perfil químico de *S. terebinthifolia* obtidos em diferentes países

Órgão da planta	Perfil químico/principais constituintes (%)	Tipo de extração/extrato	País (região)	Referência
Fruto	α -felandreno (44,2), limoneno (16,6), α -pineno (23,2), ciclohexanona-5-metil-2 (3,7), γ -muuroleno (3,3), β -mirceno (2,3), cariofileno (1,6), o-cimeno (1,9), β -pineno (0,8)	Óleo essencial	Sudeste da Tunisia	Elshafie <i>et al.</i> , (2016)
Fruto	Monoterpenos (85,8), δ -3-careno (30,4), limoneno (17,4), α -felandreno (12,6), α -pineno (12,6), mirceno (5,8), O-cimeno (3,5), sesquiterpenos (5,3).	Óleo Essencial	Espírito Santo, Brasil	Cole <i>et al.</i> , (2014)
Fruto	- Monoterpenes: β -mirceno(41), limoneno(9), α -pineno (8), β -pineno (2,3).; -sesquiterpenos: β -cubebeno (12), δ -cadineno (7,7), γ -cariofileno (3,9), α -muurolene (2,1), Copaeno (2), δ -cadinol (2), γ -muuroleno (1,9), germacreno D (1,5), β -farneseno (1,1), β -elemeno (1), γ -cadineno (1)	Óleo Essencial	Rio Grande do Sul, Brasil.	Dannenber <i>et al.</i> , (2019)
Fruto	Ácidos triterpênicos: schinol ácidos fenólicos: galato de etila (5) ácidos graxos: ácido heicosanóico (40); ácido esteárico (38,1), ácido eicosanóico (32,6), ácido palmítico (26), ácido beênico (24,4)	Fração hexano	Espírito Santo, Brasil.	Silva <i>et al.</i> , (2018)
Fruto	Frutos verdes (imaturado) α -felandreno (44,6), α -pineno (26,3), limoneno (8,3), β -felandreno (7,2), germacreno (4,4), δ -elemeno (2,2), β -mirceno (1,8), terpinoleno (1,1), p-cimeno (0,6)	Óleo Essencial	Ariana, Tunisia.	Ennigrou <i>et al.</i> , (2017).
	Frutos iniciando maturação (meio maduro) α -felandreno (46,8), α -pineno (23,2), limoneno (8,6), β -felandreno (7,4), germacreno (5,2), β -mirceno (1,8), terpinoleno (1,2), p-cimeno (0,8), δ -elemeno (0,3)			
	Vermelhos (maduros) α -felandreno (45,8), α -pineno (13,9), limoneno (8,1), germacreno (7,4), p-cimeno (6,4), β -felandreno (4,8), β -mirceno (1,8), terpinoleno (1,5), δ -elemeno (0,3)			

(continua)

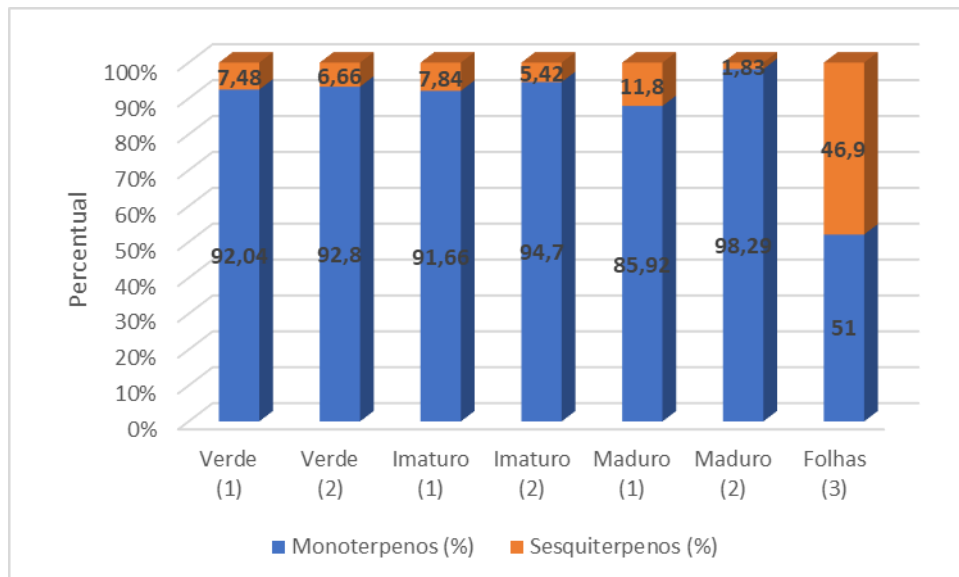
Tabela 2 – Perfil químico de *S. terebinthifolia* obtidos em diferentes países

(continuação)

Órgão da planta	Perfil químico/principais constituintes (%)	Tipo de extração/extrato	País (região)	Referência
Fruto	Ácido oleico (38,7), α -felandreno (13,3), limoneno (11,9), δ -cadineno (11,1), α -terpineol (6), α -pineno (4,7), kaempferol-3-O-rutinosídeo (2,6), α -bergamoteno (1,4), terpinen-4-ol (1,4), terpinen-4-ol (1,4), terpinol (1,4), aromadendrene (1,1), β -farneseno (1,1), α -cadinol (0,8), cosmene (0,8)	Fração Acetona	Alexandria, Egito	Salem <i>et al.</i> , (2018)
Fruto	α -pineno (36,8), α -felandreno (32,8), limoneno (11,9), α -terpineol (6,0), terpinol (3,1), α -cadinol (0,8)	Óleo Essencial	Alexandria, Egito	Salem <i>et al.</i> , (2018)
Fruto	α -felandreno (39,6), β -felandreno (22,9), α -pineno (18,4), β -selineno (10,0), o-cimeno (4,1), mirceno (1,0)	Óleo volátil por hidrodestilação	Zaghoun Tunisia	Piras <i>et al.</i> , (2017)
Frutos maduros e sementes	δ -3-careno (55,4), α -pineno (15,7), silvestreno (10,7), germacreno (2,5), β -patchouleno (2,0), mirceno (1,9), eugenol (1,7), terpinoleno (1,5), sativeno (0,9), β -cedreno (0,9), cis- α -santalol (0,8), Cis-muurola-3,5-dieno (0,8), γ -elemeno (0,4)	Óleo Essencial	Espírito Santo, Brasil.	Pratti <i>et al.</i> , (2015)
Frutos e folhas (resíduos da indústria)	Lupeol (16,3), lupenona (12,7), esqualeno (9,6), octacosano (8,2), α -tocoferol (4,9), acetato de lupeol (4,1), β -sitosterol (3,6), p-cimeno (3,1), espatulenol (2,2), ursônico aldeído 3-acetato (2,2), β -cariofileno (2,1), limoneno (1,9), olean-12-en-3-ona (1,8), cariofileno (1,7), careno (1,6), 3- α -eudesmol (1,4); α -selineno (1,1), α -pineno (1), elemeno (1), β -elemeno (1), δ -cadineno (0,9), β -selineno (0,8), fitol (0,7), γ -muuroleno (0,6), rosifoliol (0,5), γ -cadineno (0,4), α -copaeno (0,3), γ -aromadendreno (0,3), germacreno (0,2), α -muuroleno (0,2), δ -elemeno (0,2), timol (0,2); α -terpineol (0,2), humuleno (0,1)	Fração hexano	Espírito Santo, Brasil	Gomes <i>et al.</i> , (2020)

Tabela 3 - Composição de terpenos nas folhas e frutos de *S. terebinthifolia*

Órgão da Planta	Monoterpenos (%)	Sesquiterpenos (%)	Referências
Fruto Verde	92,04	7,48	Ennigrou <i>et al.</i> , (2017).
	92,8	6,66	Gerhardt (2018)
Frutos Imaturo	91,66	7,84	Ennigrou <i>et al.</i> , (2017).
	94,7	5,42	Gerhardt (2018)
Fruto Maduro	85,92	11,8	Ennigrou <i>et al.</i> , (2017).
	98,29	1,83	Gerhardt (2018)
Folhas	51,0	46,9	Piras <i>et al.</i> , (2017)

**Figura 2** – Composição de monoterpenos e sesquiterpenos nas folhas e frutos (verde, imaturo e maduro) de *S. terebinthifolia*. (1) Ennigrou *et al.*, (2017); (2) Gerhardt (2018); (3) Piras *et al.*, (2017).

A natureza e a quantidade de compostos bioativos produzidos por espécies vegetais ao longo de seu desenvolvimento podem ser significativamente afetadas por fatores como intensidade de luz, temperatura, nível de nutrição e disponibilidade de água (chamados de fatores abióticos) (QADERI *et al.*, 2023). Essa variabilidade pode ainda estar relacionada a fatores genéticos que determinam a ocorrência de polimorfismo químico na espécie.

Análises químicas dos extratos de plantas podem revelar grupos de compostos disponíveis, tanto quantitativa quanto qualitativamente, mesmo quando presentes

em quantidades mínimas. Esses produtos podem conter várias substâncias, e sua identificação pode ajudar a identificar discrepâncias entre genótipos, grupos de genótipos semelhantes (quimiotipos) e potenciais marcadores químicos (STESEVIC *et al.*, 2014).

Análise quimiométrica realizada por meio da técnica de HS-CG-EM (Headspace associada à cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massa) dos óleos essenciais extraídos em amostras de BAAR 5, BAAR 8 e BAAR 23 demonstrou que apesar dos genótipos serem mantidos sob as mesmas condições edafoclimáticas, apresentam composição química distinta, com maior prevalência de limoneno e α -felandreno (Figura 3).

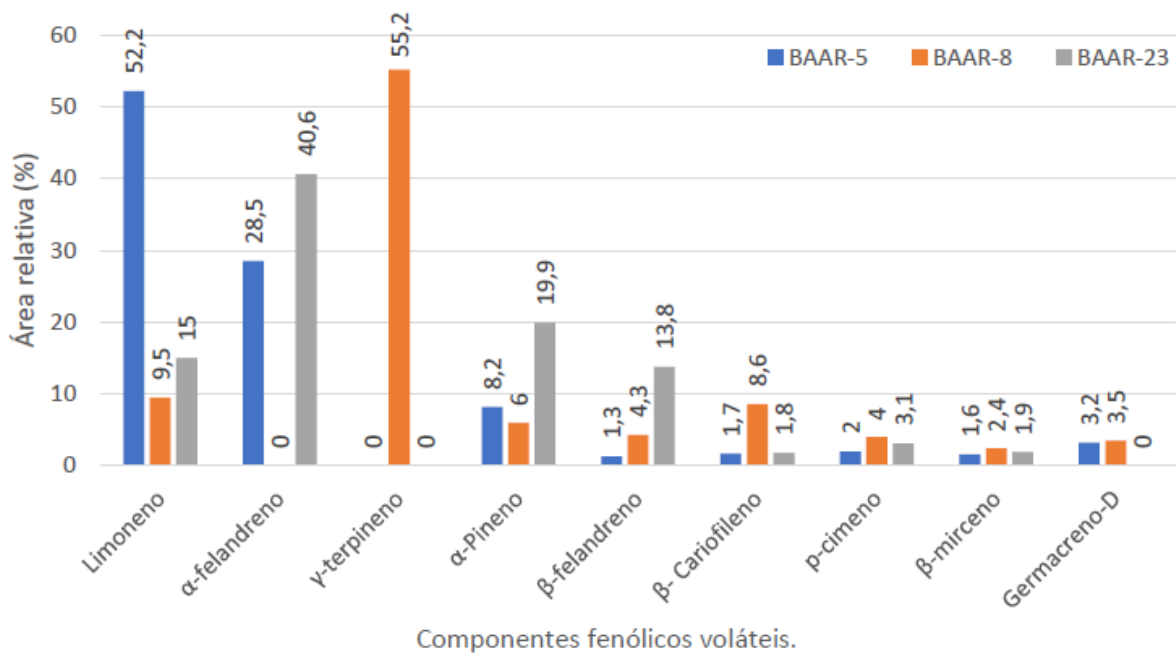


Figura 3 – Principais componentes fenólicos voláteis presentes em três diferentes genótipos (BAAR 5, BAAR 8, BAAR 23) de *S. terebinthifolia* utilizados neste estudo (GERHARDT, 2018).

A análise dos quimiotipos é uma alternativa na seleção de genótipos com maior potencial farmacêutico ou industrial, visto que proporciona a diferenciação entre clones ou espécies de um gênero e a identificação dos compostos de interesse comercial (CEVALLOS-CEVALLOS *et al.*, 2009).

Os resultados disponíveis na literatura mostram que os extratos derivados de *S. terebinthifolia* têm sido estudados para fins farmacológicos e industriais sem

considerar o genótipo da planta quanto à heterogeneidade de sua composição. Este fato justifica a importância da caracterização fenotípica de clones de *S. terebinthifolia*, conduzindo a um processo mais racional de exploração comercial.

1.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA HUMANA

A resistência a um antimicrobiano refere-se ao aumento da tolerância ao regime terapêutico estabelecido ao qual o patógeno era suscetível antes do surgimento da resistência. Desde sua descoberta, há mais de 70 anos, os medicamentos antibacterianos se tornaram uma parte essencial do cenário da saúde moderna, permitindo o tratamento de infecções bacterianas que antes ameaçavam a vida. No entanto, os níveis cada vez maiores de resistência antimicrobiana ameaçam os benefícios para a saúde alcançados com os antibióticos e esse fenômeno é reconhecido como uma crise global (VENTOLA, 2015).

A ocorrência de resistência aos antimicrobianos aumenta os custos de saúde, tempo de permanência em hospitais, morbidade e mortalidade. Há estimativas de que 10 milhões de mortes serão atribuídas à resistência antimicrobiana até 2050, e 100 trilhões de dólares da produção econômica mundial serão perdidos se esforços substanciais não forem feitos para conter esta ameaça (O'NEIL, 2016, WHO, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou, em abril de 2014, o primeiro relatório de vigilância global sobre resistência aos antimicrobianos a fim de demonstrar o impacto clínico das bactérias resistentes aos antimicrobianos em todo o mundo. Este relatório mostrou que cinco das seis regiões da OMS apresentavam mais de 50 % de resistência da *Escherichia coli* às cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas, e presença de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em ambientes hospitalares. Foram relatadas taxas de resistência da *Klebsiella pneumoniae* a cefalosporinas e carbapenêmicos de terceira geração superiores a 50 %. O relatório atribuiu 45 % das mortes na África e no Sudeste Asiático a bactérias multirresistentes (WHO, 2014).

Diversos relatórios têm demonstrado altas taxas de isolamento de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em estabelecimentos de saúde nos Camarões (72 %), África do Sul (52 %), Etiópia (42,8 %), Nigéria (29,6 %), Quênia (27,7 %), Costa do Marfim (16,8 %) e Marrocos (14,4 %) (NJOUNGANG *et al.*, 2015; PEROVIC *et al.*, 2015; WHO, 2014).

A Organização Mundial da Saúde publicou, em 2017, a sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos – um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana. A lista foi elaborada numa tentativa de orientar e promover a pesquisa, desenvolvimento e Inovação (P, D & I) de novos antibióticos, como parte dos esforços para enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos, por estes micro-organismos (OPAS, 2017).

Dentre estas bactérias, encontram-se (em classificação de Prioridade Alta), o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina (MRSA-ORSA) e a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase. A lista busca incentivar os governos a implementar políticas de incentivo à ciência básica e a P, D & I, tanto por meio de agências financiadas pelo setor público, quanto pelo setor privado, que invistam no descobrimento e desenvolvimento de novos produtos com melhor eficiência e estabilidade (OPAS, 2017).

1.1.1 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina/oxacilina (MRSA/ORSA)

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva esférica, não móvel e não formadora de esporos. Algumas linhagens podem produzir cápsula polissacarídica. Trata-se de um comensal que coloniza persistentemente a pele e as mucosas de aproximadamente 30 % da população humana. Outros 60 % das pessoas são colonizadas temporariamente (FRANK *et al.*, 2010). Os locais mais comuns são as narinas, garganta, axila, virilha, períneo e reto. As narinas anteriores são consideradas o principal reservatório de propagação de *S. aureus* (CRAFT *et al.*, 2019; CREECH, 2015).

Foi isolado pela primeira vez por Alexander Ogston durante uma investigação de septicemia e infecção em ferida ocorrida em 1880. O exame microscópico de 88 amostras de pus revelou a presença de cocos Gram-positivos, identificado posteriormente como *S. aureus* (ALGAMMAL *et al.*, 2020)

O *S. aureus* é um agente importante causador de doenças em humanos e animais. Pode resistir a condições ambientais adversas, como luz solar e dessecação. A bactéria pode invadir a pele, membranas mucosas e órgãos internos, causando doenças grave, incluindo infecções supurativas da pele, acne, osteomielite, endocardite, infecção do trato respiratório e septicemia (ALAKLOBI *et al.*, 2015; ATOUM, 2003)

Em 1928 Alexander Fleming descobriu a penicilina, porém, a partir de 1942 foram identificadas as primeiras linhagens resistentes ao antibiótico. No final da década de 1960, 80 % dos isolados clínicos eram resistentes à penicilina. Este fato demonstra o poder adaptativo do *S. aureus* à exposição a uma fonte de pressão seletiva, como os antibióticos (ALGAMMAL *et al.*, 2020).

Em resposta à disseminação mundial de *S. aureus* resistente à penicilina, beta-lactâmicos semissintéticos resistentes à penicilinase, como, primeiro, a meticilina e, posteriormente, a oxacilina foram desenvolvidos para uso clínico. A meticilina foi a primeira penicilina anti-estafilocócica semissintética desenvolvida em 1959 (AZEEZ-AKANDE, 2010). No decorrer do primeiro ano do uso clínico surgiram as primeiras linhagens de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em isolados clínicos de um paciente hospitalizado no Reino Unido no ano de 1961 (ALGAMMAL *et al.*, 2020; VESTERGAARD *et al.*, 2019).

A resistência à meticilina pode ser determinada por detecção molecular por meio da identificação do gene *mecA*, bem como por meio da detecção de resistência à cefoxitina (ALGAMMAL *et al.*, 2020). As linhagens classificadas como MRSA apresentam um padrão de multirresistência variável, incluindo inativação de macrolídeos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e lincosamidas (BARRASA-VILLAR *et al.*, 2017).

Essas cepas produzem uma lactamase (penicilinase) codificada por plasmídeo capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico presente nas moléculas de penicilinas. Como esse anel é a centro ativo das penicilinas, sua hidrólise torna o fármaco inativo.

Diferente da resistência à penicilina, a resistência à meticilina não é um resultado da inativação do fármaco, porém resulta da modificação do alvo do fármaco. As linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina expressam uma proteína adicional de ligação à penicilina (PBP), conhecida como PBP2a (CRAFT *et al.*, 2019, MO *et al.*, 2019).

Estes microrganismos podem induzir doenças infecciosas graves em humanos, como endocardite piogênica, pneumonia supurativa, otite média, osteomielite, infecções piogênicas da pele, tecidos moles e artrite séptica. O surgimento de cepas virulentas de MRSA multirresistentes é um notável problema de saúde pública (GAJDÁCS *et al.*, 2019). As infecções causadas por MRSA têm sido associadas a maiores taxas de mortalidade, maiores taxas de readmissão, maior tempo de internação e aumento dos custos de cuidados de saúde (BARRASA-VILLAR *et al.*, 2017; MACEDO-VIÑAS *et al.*, 2013).

Praticamente qualquer item em contato com a pele, como jalecos, lenços, canetas, telefones celulares podem servir como fômite para transmissão de MRSA. A colonização pode persistir por longos períodos. A colonização assintomática por MRSA aumenta o risco de doença infecciosa. Em até 50 % a 80 % dos casos de doença infecciosas a agente etiológico era comensal. O MRSA também pode persistir no ambiente doméstico, dificultando as tentativas de erradicação. Ao mesmo tempo, a colonização não é estática, já que as cepas evoluíram e até foram substituídas no mesmo hospedeiro (AZARIAN *et al.*, 2016; CLARRIDGE *et al.*, 2013; EELLS *et al.*, 2014).

Mesmo com os esforços de vigilância epidemiológica, desenvolvimento contínuo de novos antibióticos e avanços na prevenção de doenças infecciosas o MRSA continua sendo um patógeno proeminente com mortalidade persistentemente alta. Enormes esforços de pesquisa continuam a expandir nossa compreensão da diversidade genética, epidemiologia, evolução e gerenciamento de MRSA (TURNER *et al.*, 2019).

1.1.2 *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase (KPC)

O termo “KPC” surgiu de “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”, pois esta enzima (KPC) foi identificada pela primeira vez neste organismo. As bactérias resistentes aos carbapenêmicos podem produzir uma grande variedade de carbapenemases, que, de acordo com a classificação de Ambler podem ser divididas em três grupos: classe A, classe B e classe D. Existe uma quarta classe, Ambler classe C, no entanto, sua relevância clínica permanece desconhecida (SUAY-GARCIA., 2019). A KPC está inserida no grupo das carbapenemases da classe A. Ela possui um resíduo de serina em seu sítio ativo e são compostas por 265-269 aminoácidos. Até o momento, pelo menos dezenove variantes de KPC foram relatadas, embora KPC-2 e KPC-3 pareçam ser mais prevalentes (PORRECA *et al.*, 2018)

KPC é codificada por plasmídeo, hidrolisa ativamente os carbapenêmicos e é parcialmente inibida pelo ácido clavulânico. Sua relevância clínica se deve ao fato de ser a mais prevalente e mais amplamente difundida em todo o mundo. Bactérias produtoras de KPCs adquirem multirresistência aos β -lactâmicos, o que limita as opções terapêuticas para tratar infecções causadas por esses microrganismos. Apesar de terem sido encontradas primariamente em *K. pneumoniae*, isolados clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* foram identificados como produtores (OKOCHE *et al.*, 2015; PORRECA *et al.*, 2018; SUAY-GARCÍA *et al.*, 2019).

A enzima KPC possui um sítio ativo grande e raso, possibilitando a acomodação de uma ampla gama de antibióticos com anel β -lactâmico, incluindo cefalosporinas, monobactamas e carbapenêmicos. Isolados que produzem enzimas do tipo KPC não são apenas resistentes à maioria dos β -lactâmicos, mas também são frequentemente multirresistentes, porque codificam adicionalmente uma infinidade de outros genes de resistência, tornando-os virtualmente pan-resistentes a muitas das opções de primeira linha atualmente disponíveis para terapia (PORRECA *et al.*, 2018).

O surgimento de bactérias produtoras de carbapenemases levou ao desenvolvimento de infecções graves associadas a altas taxas de morbidade e

mortalidade (BEN-DAVID *et al.*, 2017). Em 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou um relatório que afirmava que a *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos se espalhou por todas as regiões do mundo (WHO, 2015). Existem vários elementos que contribuíram para a rápida disseminação dos KPCs, como a presença de genes transmitidos por plasmídeos e viagens internacionais generalizadas (PITOUT *et al.*, 2015).

Em função da resistência aos antibióticos, as infecções causadas por esses organismos costumam ser difíceis de tratar. Os agentes utilizados costumam incluir a combinação de carbapenêmicos, polimixinas, fosfomicina, tigeciclina, aminoglicosídeos, ceftazidima-avibactam e meropenem-vaborbactam. Novos tratamentos com atividade contra KPCs estão sendo estudados para ajudar a mitigar a ameaça de resistência (PORRECA *et al.*, 2018).

β -Lactamases do tipo KPC não são inibidas por clavulanato ou tazobactam; no entanto, elas são bem inibidas pelos novos inibidores de β -lactamase, como avibactam, relebactam e vaborbactam. Porém, as cepas que abrigam mutantes de blaKPC podem se tornar resistentes à ceftazidima-avibactam por meio do aumento da atividade catalítica da ceftazidima (PORRECA *et al.*, 2018)

O primeiro estudo a relatar a detecção de carbapenemases no Brasil foi publicado em 2009 (MONTEIRO *et al.*, 2009) e descreveu a presença de KPC-2 em *K. pneumoniae* de quatro pacientes na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil, 10 anos após a primeira detecção do KPC-2 no mundo, na Carolina do Norte, Estados Unidos. Posteriormente, KPC-2 foi descrita em outras espécies de Enterobactérias distribuídas por todo o país. Porém, a *K. pneumoniae* é a espécie mais frequente identificada como produtora de carbapenemases (MONTEIRO *et al.*, 2009; RARO *et al.*, 2020; YIGIT *et al.*, 2001).

A resistência a antibacterianos por bactérias clinicamente relevantes é uma das ameaças mais iminentes à saúde pública e especialmente às populações de pacientes vulneráveis. A síntese de KPC por enterobactérias é considerada como a ocorrência de pandemia de maior sucesso na história das bactérias Gram-negativas, particularmente devido a *K. pneumoniae* (PATEL *et al.*, 2013). A Organização Mundial da Saúde reconheceu a resistência antimicrobiana como “uma ameaça à segurança global da saúde que requer ação em setores governamentais e na sociedade como um todo”. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC)

estima que os custos diretos de saúde associados à resistência antimicrobiana cheguem a US\$ 20 bilhões, e os custos adicionais para a sociedade pela perda de produtividade de até US\$ 35 bilhões por ano apenas nos Estados Unidos (CDC, 2013).

1.2 FUSARIOSE DO ABACAXI

As doenças de plantas e frutos são grandes problemas em condições de campo e pós-colheita e a fusariose do abacaxi, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* é uma preocupação constante, levando a perdas de 30 % a 40 % de frutos e 15 % a 20 % de perdas de material propagativo (VENTURA *et al.* 2009).

O fungo infecta todas as partes da planta, com destaque para a inflorescência, a infrutescência e o material propagativo (STEPIEN *et al.*, 2013). O patógeno utiliza aberturas naturais (flores abertas, rachaduras nos frutos em crescimento) ou artificiais (ferimentos, lesões por insetos) para infectar os tecidos e causar doença (SILVA *et al.*, 2014; VENTURA *et al.* 2009; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

O controle químico é recomendado, mas o uso constante de fungicidas azólicos sistêmicos têm selecionado isolados fúngicos resistentes (KORRES *et al.*, 2011).

O controle da fusariose requer a integração de diversas práticas culturais como a utilização de material propagativo sadio e fiscalização constante no plantio, retirando o material infectado e realizando o controle químico. No entanto, essas práticas têm alto custo e o controle químico pode causar danos ao meio ambiente (VENTURA; COSTA, 2002). Conseqüentemente, o investimento na tecnologia relacionada ao uso de bioinsumos poderia ampliar as possibilidades de métodos de controle dos fitopatógenos e ainda reduzir o impacto.

1.2.1. Biocontrole de fitopatógenos

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), bioinsumo é considerado

[...] o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos (BRASIL, 2022).

O Brasil é reconhecido mundialmente pela vocação para agricultura, entre outros motivos em função do clima, extensão territorial, regularidade dos índices pluviométricos e diversidade vegetal. O Brasil apresenta grande potencial para conhecer, conservar e explorar a sua biodiversidade, transformando-a em ativos biológicos em substrato para expansão e fortalecimento de um sistema produtivo agrícola mais sustentável. Assim, potencializa-se o uso de bioinsumos, insumos de origem biológica, farto no Brasil, considerando a vasta biodiversidade local (GINDRI *et al.*, 2020; MEYER *et al.*, 2022).

O uso de bioinsumos é uma promessa tecnológica que abre possibilidade de aplicar soluções inovadoras que permitam um crescimento sustentável da agricultura. Também é chamado de produto biológico, bioproduto, produto de base biológica ou ainda, bioinseticida, biofertilizante (GINDRI *et al.*, 2020).

A prospecção de insumos bioativos em extratos vegetais é uma estratégia amplamente utilizada na busca de novos compostos que possam ser utilizados na agricultura (YAKHIN *et al.*, 2017). A utilização de extratos vegetais remonta ao início da agricultura, porém a ampliação tecnológica dos métodos de extração e identificação molecular acelerou o desenvolvimento da área e formulação de produtos comerciais. No Brasil existem produtos registrados no MAPA à base de óleo de Nim, extrato de melaleuca, extrato de alho, extrato de *Reynoutria sachalinensis* e extrato de *Sophora flavescens* (MEYER *et al.*, 2022)

Com a diversidade da flora no Brasil, o desenvolvimento de bioinsumos tem um grande potencial, havendo a necessidade que ocorra a intensificação de estudos que possam identificar o perfil químico das plantas, além da seleção de espécies e

clones com maior potencial na produção de substâncias bioativas, inclusive aquelas relacionadas ao controle de microorganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar quatro clones de *S. terebinthifolia* quanto à composição química e atividade antibacteriana e antifúngica de seus extratos polares e apolares para *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) e *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antibacteriana para ORSA e KPC de extratos hidroetanólicos (polares) e hexânicos (apolares) obtidos em clones de *S. terebinthifolia*.

Verificar o efeito inibitório de extratos polares de clones de *S. terebinthifolia* no crescimento micelial de *F. guttiforme* por meio da técnica de Pour Plate.

Verificar o efeito inibitório no desenvolvimento de *F. guttiforme* de extratos polares e apolares de clones de *S. terebinthifolia* por meio de técnica de dispersão em superfície.

Verificar o perfil cromatográfico por meio da técnica de CLAD de extratos polares e apolares obtidos em clones de *S. terebinthifolia*

Identificar por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) o perfil químico de extratos hexânicos apolares de frutos maduros de quatro clones de *S. terebinthifolia*.

Identificar por Espectrometria de Massas (ESI (-) FT-ICR MS) os principais compostos presentes nos extratos hidroetanólicos produzidos a partir de frutos maduros de quatro clones de *S. terebinthifolia*.

Selecionar e recomendar para registro/proteção clones com potencial de uso no controle de bactérias e fungos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Foram avaliados os frutos maduros provenientes de quatro clones de *S. terebinthifolia* (BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9 e BAAr 23) do Banco de Germoplasma de Aroeira do Incaper (BAAr-Banco Ativo de Aroeira), coletados em junho de 2019. Das plantas matrizes foram preparadas exsicatas depositadas no herbário VIES, da Universidade Federal do Espírito Santo, em Vitória, ES, que possui registro no Index Herbariorum (catálogo mundial sob a coordenação do Jardim botânico de Nova York), sob os nºs 39056; 39057; 39058; 39059 e 39060, clonadas.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO A PARTIR DE FRUTOS *S. terebinthifolia*

3.2.1 Extração hexânica (apolar) e hidroalcóolica (polar)

O processo de extração foi realizado conforme método descrito por Gomes *et al.* (2020). Os frutos maduros dos diferentes clones de aroeira foram previamente triturados de maneira individual por meio da utilização de grau e pistilo de porcelana (Figura 4A). Posteriormente, em um Erlenmeyer com tampa de vidro esmerilhada, 150 g de frutos maduros foram expostos à temperatura ambiente (25 °C - maceração), em ausência de luz, a 200 mL⁻¹ do solvente orgânico hexano (Hex) por 24 horas (Figura 4B). Após este intervalo o solvente foi extraído e uma nova porção (200 mL⁻¹) de hexano foi adicionada. Este processo foi repetido após 24 horas.

Utilizando a mesma metodologia, 50 g de frutos maduros de cada um dos clones foram expostos a uma solução hidroetanólica (HidrEt) 54 % (v/v).



Figura 4 – Amostra de frutos de aroeira, clone BAAR 8, triturados com grau e pistilo de porcelana (A). Extração por meio do uso de solvente hexano em duas amostras de frutos de aroeira (B).

3.2.2 Secagem das amostras em evaporador rotativo

Após a extração, todos os produtos foram secos por meio do uso de evaporador rotativo (Fisatom® 802) acoplado a bomba de vácuo (GS® VAC30) e banho-maria (Fanem® 1102) (Figura 5).

As amostras extraídas por meio do uso de hexano foram evaporadas a 80 RPM (rotações por minuto), em pressão negativa (vácuo) de 550 mmHg a 40 °C. Aquelas extraídas por meio do uso de solução hidroetanólica foram evaporadas a 100 RPM (rotações por minuto), em pressão negativa (vácuo) de 600 mmHg a 55 °C.



Figura 5 – Secagem das amostras por meio do uso de Evaporador rotativo (Fisatom® 802) acoplado a bomba de vácuo (GS® VAC30) e banho-maria (Fanem® 1102).

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AROEIRA EM AMOSTRAS DE *S. aureus* RESISTENTE À OXACILINA (ORSA) e *Klebsiella pneumoniae* PRODUTOR DE CARBAPENEMASE (KPC).

3.3.1 Linhagens dos microrganismos

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada para dez linhagens de bactérias isoladas em diferentes hospitais do Espírito Santo, Brasil e um fungo filamentosso fitopatogénico.

As amostras bacterianas foram identificadas e avaliadas quanto à susceptibilidade antimicrobiana por meio de método automatizado, utilizado o equipamento BD Phoenix 100 (BD®). A confirmação da produção da enzima carbapenemase (KPC) foi realizada por meio do teste de Hodge modificado (CLSI, 2010) e Carbapenembac® (Probac® do Brasil).

Neste estudo foram utilizadas cinco linhagens de bactérias produtoras da enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase) e cinco linhagens de

Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina (ORSA). As seguintes linhagens de referência da American Type Culture Collection (ATCC) também foram avaliadas: *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.3.2 Teste de microdiluição em caldo

A menor concentração dos extratos vegetais necessária para inibir (Concentração Inibitória Mínima – MIC) ou eliminar (Concentração Bactericida Mínima – MBC) o crescimento das bactérias foi determinado por meio da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2012b) com adaptações (DANNENBERG *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2020; PARIMALA; SHOBA, 2014).

As linhagens bacterianas foram cultivadas previamente em ágar Mueller-Hinton por 20–24 h a 37 °C. As colônias foram suspensas em solução salina (0,85 %) esterilizada e avaliadas em espectrofotômetro (Biospectro® SP-22) em comprimento de onda de 625 nm e absorvância de 0,08 a 0,1. Esta concentração equivale ao padrão 0,5 da escala de McFarland e corresponde à presença de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Soluções estoque dos extratos hexânicos (1.500 mg mL⁻¹) e hidroetanólicos (400 mg mL⁻¹) foram solubilizados respectivamente com DMSO e água.

O meio de cultivo utilizado foi o caldo Mueller-Hinton (Kasvi®), esterilizado. Em casos de procedimentos envolvendo amostras hexânicas, foi suplementado com 4 % de dimetilsulfóxido (DMSO).

A microdiluição foi realizada em microplacas esterilizadas de fundo chato (CRAL®). Cada um dos poços foi preenchido com 180 µL de caldo Mueller-Hinton suplementado com o extrato avaliado em concentrações decrescentes de 400 mg mL⁻¹, 200 mg mL⁻¹, 100 mg mL⁻¹, 50 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹, 12,5 mg mL⁻¹, 6,25 mg mL⁻¹, 3,125 mg mL⁻¹, 1,56 mg mL⁻¹, 0,75 mg mL⁻¹. Em seguida foram adicionados 20 µL de suspensão bacteriana em cada poço teste e no controle positivo de crescimento, onde havia apenas o meio de cultivo. Os poços de controle negativo foram preenchidos com 180 µL do meio de cultivo esterilizado.

Os resultados foram avaliados por meio de observação visual do crescimento bacteriano após 24 h de incubação a 37 °C, e confirmado após a adição de 20 µL de solução de resazurina (0,015 % p/v) e incubação adicional por 3 h a 37 °C. A MIC foi considerada a concentração mínima do extrato capaz de inibir o crescimento visível das bactérias.

A determinação da MBC foi realizada por meio da coleta de cinco microlitros de solução de cada poço semeados em ágar Mueller-Hinton e incubado por 24 h a 37 °C. A MBC foi considerada a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em duplicata, conforme representação esquemática (Figura 6 e Figura 7).

	EXTRATO DE BAAr 5 – (mg mL ⁻¹)										Controles	
BAC 1	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP
BAC 2	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP
BAC 3	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP
BAC 4	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,75	CN	CP

Figura 6 – Representação esquemática do experimento de microdiluição em caldo, em microplaca, de uma amostra de extrato vegetal com 4 bactérias. O experimento foi realizado em duplicata. CN: controle negativo; CP: controle positivo; BAC: bactéria; BAAr (Banco Ativo de Aroeira): Clone número 5 da Aroeira.

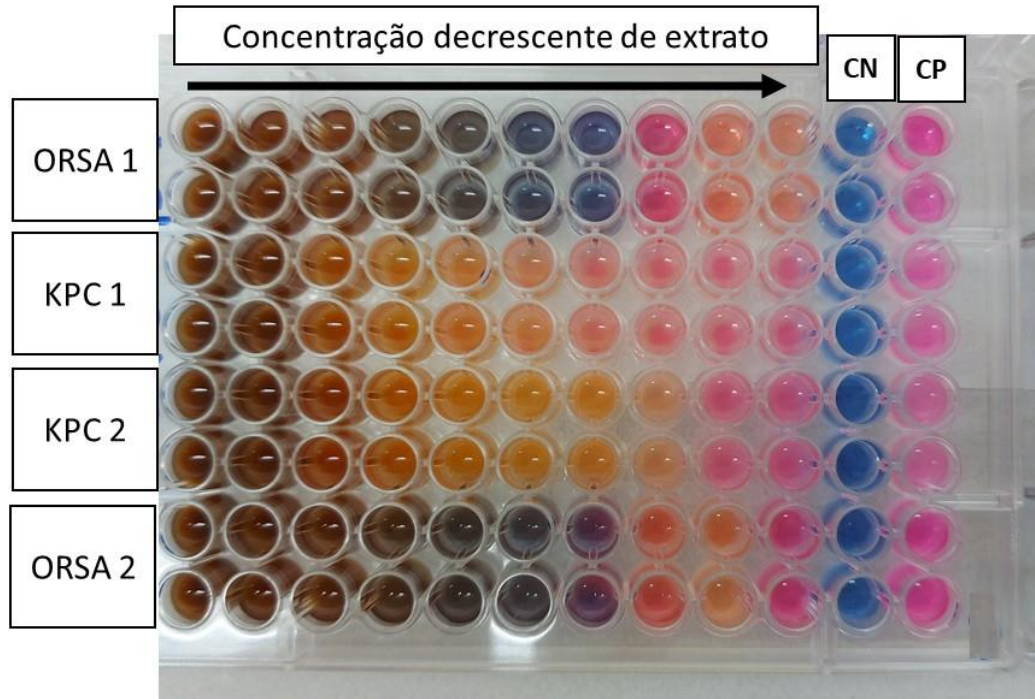


Figura 7 – Leitura do experimento de microdiluição em caldo para verificação da MIC de uma amostra de extrato vegetal com 4 bactérias (2 ORSA e 2 KPC). O experimento foi realizado em duplicata. CN: controle negativo; CP: controle positivo; ORSA (*Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina); KPC (*Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos).

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CLONES DE AROEIRA EM *Fusarium guttiforme*.

3.4.1 Microrganismo

A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada para o fungo filamentosso *Fusarium guttiforme*, isolado identificado como E-807, proveniente da micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER). As culturas foram mantidas em tubos inclinados de ágar batata dextrose (PDA, Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) a 4 °C.

3.4.2 Efeito inibitório *in vitro* de extratos hidroetanólicos de aroeira no crescimento micelial de *Fusarium guttiforme* - Técnica de Pour Plate.

O efeito inibitório dos extratos hidroetanólicos polares no crescimento micelial de *F. guttiforme* foi determinado seguindo o método previamente relatado por Chen *et al.* (2020), com modificações. A solução estoque de extrato foi dissolvida em água destilada esterilizada e solubilizada em ágar batata dextrose (Kasvi®), distribuídos em placas de Petri esterilizadas, para obtenção das concentrações finais decrescentes de 100,0 g L⁻¹; 50,0 g L⁻¹; 25,0 g L⁻¹; 12,5 g L⁻¹; 6,25 g L⁻¹; 3,12 g L⁻¹ e 1,56 g L⁻¹. Um disco de micélio (6 mm de diâmetro) retirado de uma cultura de *F. guttiforme* com sete dias de incubação foi colocado no centro de cada placa de Petri (90 mm de diâmetro). Em seguida, todas as placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias e medidos os diâmetros diariamente das colônias dos grupos tratados com extrato e controle sem tratamento. Os experimentos foram realizados em duplicata. Para calcular a inibição do crescimento micelial (PMGI) (DUARTE *et al.*, 2023), foi usada a fórmula (1):

$$\text{PMGI (\%)} = (\text{dt} - \text{dc}) / \text{dc} \times 100 \quad (1)$$

Onde, “dt” é o diâmetro final da cultura fúngica para cada tratamento após 72 h; “dc” indica o diâmetro da colônia do controle de crescimento (ausência de extratos/fatores inibitórios).

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada como a menor concentração de extrato que inibiu completamente o crescimento de *F. guttiforme* após 48 h de incubação a 25 °C. A concentração fungicida mínima (MFC) foi considerada a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento fúngico visível em uma placa de ágar batata dextrose após 4 dias de incubação a 25 °C (CHEN *et al.*, 2020).

3.4.3 Efeitos no desenvolvimento de *Fusarium guttiforme* de extratos hidroetanólicos e hexânicos de aroeira (Dispersão em superfície).

O efeito de inibição micelial dos oito extratos vegetais foi testado (DUARTE *et al.*, 2023). Dessa forma, 100 µL dos extratos vegetais dissolvidos em DMSO (Extratos apolares) ou água (extratos polares) na concentração de 200 mg mL⁻¹ foram derramados e espalhados nas superfícies de placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (Kasvi®), usando uma espátula Drigalski estéril. Em seguida, discos de micélio de *F. guttiforme* (6 mm), previamente incubados por 7 dias, foram colocados no centro da placa usando uma pinça estéril. O experimento teve controle positivo com o antifúngico comercial itraconazol (5 µg mL⁻¹) (EMS®), controle de solvente com DMSO e controle de crescimento (placa com disco de micélio sem qualquer substância). Após 24 h, 48 h e 72 h, o crescimento micelial foi avaliado pela média medindo o diâmetro (mm) da cultura fúngica em duas direções perpendiculares. O teste foi realizado em duplicata. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PMGI) foi calculado após 72 h de incubação de acordo com a fórmula: $PMGI (\%) = (dt - dc) / dc \times 100$.

3.5 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (CLAD)

Foram verificados os perfis cromatográficos dos extratos hexânicos (apolar) e dos extratos hidroetanólicos (polar) obtidos a partir dos quatro clones de *S. terebinthifolia*, totalizando oito amostras (extratos). A técnica foi realizada utilizando uma coluna PhenoSphere-Next, C18, 5 µ, 250 x 4,6 mm (Phenomenex®) em sistema HPLC LC-20AT Prominence (Shimadzu®).

Os extratos hexânicos (100 mg) e hidroetanólico (10 mg) foram solubilizados em 1 mL⁻¹ de etanol (grau CLAD) e filtrados através de uma membrana filtrante de 0,22 µm. O volume de injeção por corrida foi de 25 µL. A fase móvel consistiu em metanol e água em proporção de 7:3 bombeado de forma isocrática a uma taxa de fluxo de

0,6 ml/min por 13 minutos (hidroetanólico) ou 18 minutos (hexânico) e detectado pelo detector de UV/VIS em comprimento de onda de 250 nm.

3.6 PERFIL QUÍMICO POR CG-EM DE EXTRATOS HEXÂNICOS DE FRUTOS MADUROS DE QUATRO CLONES DE AROEIRA.

3.6.1 Derivatização das amostras

Cerca de 1 mg das amostras (BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9, BAAr 23) foram solubilizadas em 300 μ L de KOH/MeOH 0,5 mol L⁻¹ e submetidas a refluxo à temperatura de 60 °C com agitação por 30 minutos. Em seguida, uma alíquota de 300 μ L de BF₃ em metanol foi adicionada ao frasco contendo a mistura hidrolisada. O frasco selado contendo a mistura reacional foi aquecido a 60 °C por 30 minutos. Após a etapa de derivatização, foram adicionados 300 μ L de água e 400 μ L de n-hexano. A fase hexânica foi recuperada e injetada diretamente no sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

3.6.2 Análise por CG-EM de amostras metiladas.

Uma alíquota de 1 μ L de cada amostra foi injetada em um sistema de CG-EM Shimadzu GC 2010 Plus/GCMS - QP2010 Ultra no modo split (10:1) (Figura 8) equipado com coluna capilar VB-5 (30 m x 320 μ m x 0,25 μ m). O hélio foi usado como gás de arraste a 1,5 mL por min. Programa de temperatura do forno: temperatura inicial de 40 °C permanecendo por 3 min com taxa de 5 °C por min até 110 °C, permanecendo por 1 min e taxa de 12 °C por min até 290 °C permanecendo por 15 min. T^o injetor: 290 °C e T^o interface: 260 °C. O espectrômetro de massas com analisador quadrupolo e ionização por elétrons a 70 eV operando no modo varredura (full scan, faixa de massas m/z 40 a 500) com corte de solvente em 3,5 min e fonte iônica a 230 °C. A identificação dos componentes das amostras foi realizada por comparação dos espectros de massas com a bibliotecas computacionais NIST11 e Wiley7 (similaridade > 90 %).



Figura 8 – Cromatógrafo gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM). Modelo GC 2010 Plus/GCMS - QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan.

3.7 PERFIL QUÍMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E RESSONÂNCIA CICLOTRÔNICA DE ÍONS COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ESI(-)FT-ICR MS)

Os extratos hidroetanólicos dos frutos de quatro clones de aroeira foram analisados por ESI(-)FT-ICR MS para determinação do perfil químico. As amostras foram solubilizadas (1 mg mL^{-1}) em uma solução de acetonitrila:água (1:1) que foi infundida a uma taxa de $5 \text{ } \mu\text{L/min}$ na fonte de eletrospray (ESI) operada em modo negativo. O espectrômetro de massa (modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), (Figura 9) foi configurado para operar em uma faixa de 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 $200 \text{ } ^\circ\text{C}$. O tempo de acumulação dos íons foi de 0,010 s e cada espectro foi adquirido acumulando 32 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo em conjuntos de dados de domínio do tempo de 16 megapontos. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o software *Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).



Figura 9 - Espectrômetro de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (ESI (-) FT - ICR MS). Modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de natureza quantitativa foram analisados por meio de medidas de resumo de dados como média, mediana e desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando as variáveis não apresentaram distribuição de probabilidade normal ($p < 0,05$), as comparações foram realizadas por meio de testes não paramétricos. A comparação entre os tipos de aroeira foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, já a comparação entre os tipos de bactérias foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Para comparar HEX MIC e HidrEt MIC, e também HEX MBC e HidrEt MBC, foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. Para as comparações foi considerado um nível de significância de 5 %, assim valores de p menores do que 0,05 indicam resultado significativo. As análises foram realizadas no programa IBM SPSS *Statistics (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 27 (IBM, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE AROEIRA EM BACTÉRIAS ORSA e KPC.

Os extratos polares e apolares provenientes de todos os clones de aroeira mostraram atividade antimicrobiana frente às bactérias multirresistentes avaliadas no estudo (Tabela 4). A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais varia em função do solvente utilizado. Os extratos obtidos por meio do uso de solução hidroetanólica como agente extrator apresentaram maior atividade antimicrobiana, ou seja, menores valores de MIC ($\leq 0,75$ a $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$) quando comparados àqueles obtidos por meio do uso de hexano ($\leq 12,5$ a 25 mg mL^{-1}) como agente extrator ($p < 0,05$). Infere-se que a solução polar (água e etanol) extraiu mais substâncias antibacterianas da planta do que a solução apolar (hexano) (Tabela 4, Tabela 6).

Tabela 4 - Comparação entre os valores da Concentração Inibitória Mínima (MIC^a) de extratos hexânicos e hidroetanólicos em bactérias ORSA e KPC.

Extrato	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
Hexânico	69,4	68,0	37,5	12,5	200,0	< 0,05
Hidroetanólico	4,49	4,27	2,34	0,75	12,5	

^a Valores expressos em mg mL^{-1} .

Ruas (2016) observou que os frutos e folhas de aroeira possuem maior quantidade de constituintes hidrofílicos (polares) quando comparados aos lipofílicos (apolares). Gomes *et al.* (2020) ao realizarem extração em folhas e frutos de aroeira com solução hidroetanólica e com hexano obtiveram, respectivamente, 23,62 % e 4,39 % de rendimento. A maior eficiência na extração possibilita o isolamento de uma maior quantidade e diversidade de substâncias, apesar de não ser possível afirmar que são moléculas biologicamente mais ativas. A atividade antimicrobiana dos compostos fitoquímicos parece resultar da sinergia entre os diversos mecanismos de ação dos vários compostos sintetizados por meio do metabolismo secundário das plantas (LEE; LEE, 2010).

Os estudos de Gomes *et al.*, (2020) demonstraram que a composição química dos extratos de *S. terebinthifolia* pode variar em função do uso de hexano ou solução hidroetanólica. A atividade antimicrobiana mais intensa dos extratos polares obtidos a partir de *S. terebinthifolia* pode ser justificada pela presença de compostos fenólicos como ácido gálico, metilgalato, galoilglicose, flavonóides e taninos, como o galotanino, enquanto nos extratos apolares, quando extraídos por meio de diclorometano e hexano, os triterpenos foram os principais componentes observados no estudo de Gomes *et al.* (2020). Silva *et al.* (2018) obtiveram resultados semelhantes ao observar alta concentração de esquinol (triterpeno) e baixa concentração de galato de etila (fenólico) em extrato hexânico (apolar) de aroeira. Porém, quando o acetato de etila (polar) foi utilizado como solvente houve maior concentração de galato de etila e menor concentração de esquinol.

Os compostos fenólicos são encontrados em abundância nos vegetais. Muitos flavonóides naturais apresentam atividade antibacteriana contra Gram-positivos e Gram-negativos, provavelmente devido à sua capacidade de inibir DNA girase, a função da membrana celular e o metabolismo de energia bacteriana (BARBIERI *et al.*, 2017). Os taninos apresentam atividade antimicrobiana por meio da habilidade de se ligar a macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, sequestrar radicais livres e apresentar atividade antioxidante, e por fim, ligar-se a íons metálicos. Estes mecanismos inibem bactérias, fungos e insetos (JESUS; CUNHA, 2012).

A menor atividade antimicrobiana dos compostos extraídos em solventes apolares (hidrofóbicos) pode ser justificada pela presença de LPS na parede de bactérias Gram-negativas, pois esta estrutura limita a difusão de compostos hidrofóbicos através da membrana externa (RAI *et al.*, 2017).

Os extratos hexânicos e hidroetanólicos foram mais ativos em bactérias Gram positivas ($p < 0,05$) (Tabela 5; Figura 10; Figura 11). Dados da literatura já demonstraram que extratos (GUERRA *et al.*, 2000; BRAGA *et al.*, 2007; ULIANA *et al.*, 2016) e óleos essenciais (DANNENBERG *et al.*, 2019) de *S. terebinthifolia* apresentam atividade antibacteriana superior em bactérias Gram positivas em comparação com as bactérias Gram negativas. Este fato está relacionado às características estruturais das próprias bactérias.

Tabela 5 – MIC^a e MBC^a dos extratos hexânicos e hidroetanólicos para bactérias ORSA e KPC

Extrato/ Teste	Bactéria	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
Hexânico/ MIC	ORSA	18,8	6,4	19,0	12,5	25,0	< 0,05
	KPC	120,0	63,7	100,0	50,0	200,0	
Hexânico/ MBC	ORSA	215,0	133,9	200,0	50,0	400,0	< 0,05
	KPC	350,0	88,9	400,0	200,0	400,0	
Hidroetanólico/ MIC	ORSA	1,2	0,4	1,2	0,8	1,6	< 0,05
	KPC	7,8	3,7	6,3	3,1	12,5	
Hidroetanólico/ MBC	ORSA	41,9	33,6	25,0	6,3	100,0	< 0,05
	KPC	345,0	99,9	400,0	100,0	400,0	

^aMIC (Concentração Inibitória Mínima) e MBC (Concentração Bactericida Mínima), valores expressos em mg mL⁻¹; ORSA (*Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina); KPC (*Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos).

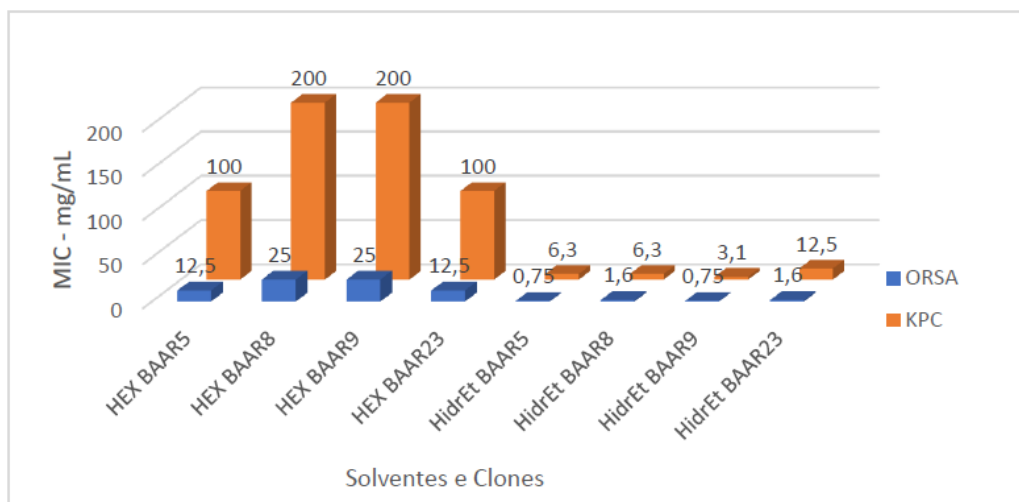


Figura 10 – Mediana da MIC (concentração inibitória mínima) dos extratos hexânicos (Hex) e hidroetanólicos (HidrEt) extraídos dos clones de aroeira BAAR 5, BAAR 8, BAAR 9 e BAAR 23 para as bactérias ORSA e KPC.

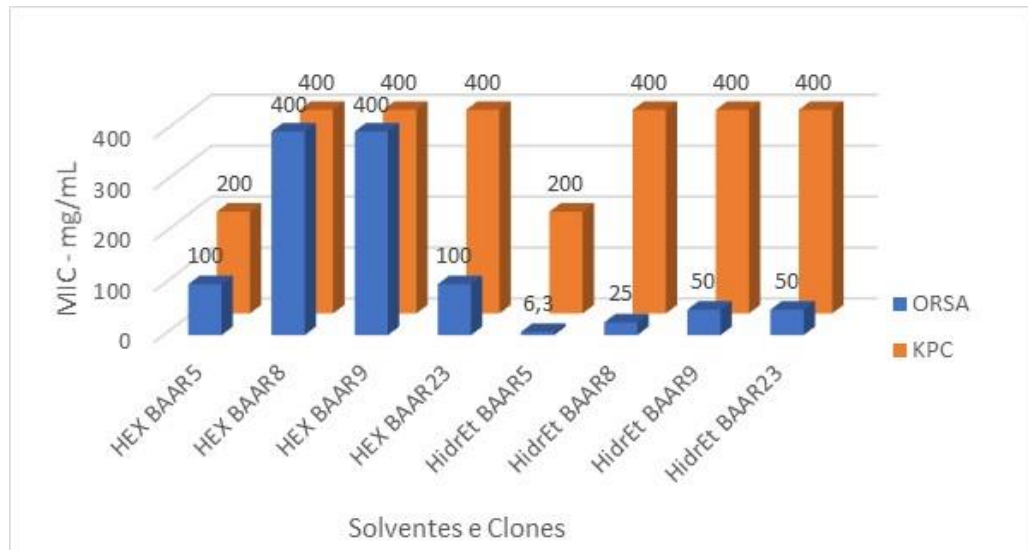


Figura 11 – Mediana da MBC (concentração bactericida mínima) dos extratos hexânicos (Hex) e hidroetanólicos (HidrEt) extraídos dos clones de aroeira BAAR 5, BAAR 8, BAAR 9 e BAAR 23 para as bactérias ORSA e KPC.

Enquanto as células Gram-positivas possuem apenas uma camada, composta principalmente de peptidoglicano, as Gram-negativas possuem uma membrana externa extra composta por uma camada dupla de lipopolissacarídeo (LPS) (NAZZARO *et al.*, 2013). Esta densa camada de LPS encontrada em bactérias Gram-negativas seria mais resistente à passagem de pequenas moléculas antimicrobianas do que a espessa, mas menos densa, camada de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas (RAI *et al.*, 2017).

Tabela 6 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) de extratos hexânicos (Hex) e hidroetanólicos (HidrEt) dos frutos de quatro diferentes quimiotipos de *S. terebinthifolia*.

BACTÉRIAS	Quimiotipos de <i>S. terebinthifolia</i>															
	BAAr 5				BAAr 8				BAAr 9				BAAr 23			
	Hex		HidrEt		Hex		HidrEt		Hex		HidrEt		Hex		HidrEt	
	MIC ^a	MBC ^a	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ORSA 1	≤ 12,5	100	≤ 0,75	6,25	25	200	1,56	25	25	200	≤0,75	50	12,5	100	1,56	50
ORSA 2	≤ 12,5	200	≤ 0,75	6,25	25	400	1,56	100	25	400	≤0,75	100	12,5	200	1,56	100
ORSA 3	≤ 12,5	50	≤ 0,75	6,25	25	200	1,56	25	25	200	≤0,75	25	12,5	100	1,56	25
ORSA 4	≤ 12,5	100	≤ 0,75	6,25	25	400	1,56	25	25	400	≤0,75	25	12,5	100	1,56	50
ORSA 5	≤ 12,5	50	≤ 0,75	12,5	25	400	1,56	100	25	400	≤0,75	50	12,5	100	1,56	50
Média	≤ 12,5	100	≤ 0,75	7,5	25	320	1,56	55	25	320	≤0,75	50	12,5	120	1,56	55
Mediana	≤ 12,5	100	≤ 0,75	6,3	25,0	400,0	1,56	25	25	400	≤0,75	50	12,5	100	1,6	50
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≤ 12,5	50	≤0,75	25	50	100	3,12	100	50	200	1,56	50	50	100	1,56	50
KPC 1	100	200	6,25	200	100	400	6,25	≥400	200	400	3,12	400	100	400	12,5	400
KPC 2	200	400	6,25	200	200	400	12,5	≥400	200	400	12,5	≥400	100	400	12,5	400
KPC 3	100	200	6,25	200	50	400	6,25	≥400	50	400	3,12	400	50	400	6,25	400
KPC 4	50	200	6,25	100	200	200	6,25	≥400	200	400	3,12	400	100	400	12,5	400
KPC 5	50	200	3,12	200	200	400	12,5	≥400	100	400	6,25	400	50	400	12,5	400
Média	100	240	5,62	180	150	360	8,75	≥400	150	400	5,622	400	80	400	11,25	400
Mediana	100	200	6,3	200	200	400	6,3	≥400	200	400	3,1	400	100	400	12,5	400
<i>E. coli</i> ATCC 25922	50	100	1,56	50	50	50	6,25	400	100	200	3,12	200	50	100	6,25	200

^a Valores expressos em mg mL⁻¹.

Os clones apresentaram atividade antimicrobiana distinta para as bactérias avaliadas. O extrato hexânico do clone BAAr 5, quando avaliado para as bactérias Gram positivas (ORSA), apresentou valores de MIC ($\leq 12,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e MBC ($50\text{-}200 \text{ mg mL}^{-1}$) inferiores aos MICs ($12,5\text{-}25 \text{ mg mL}^{-1}$) e MBCs ($100\text{-}200 \text{ mg mL}^{-1}$) dos clones BAAr 8, BAAr 9, BAAr 23. Apesar de os quatro exemplares avaliados pertencerem à mesma espécie, apresentaram atividade antimicrobiana distinta. Este dado demonstra que a atividade antimicrobiana dos clones de *S. terebinthifolia* podem variar dentro desta mesma espécie, provavelmente em função do perfil químico dos clones avaliados.

Gerhardt (2018) identificou alta concentração de limoneno (52,2 %) no clone que apresentou maior atividade antimicrobiana (BAAr 5). Os clones BAAr 8 e BAAr 23 apresentaram menor concentração de limoneno, respectivamente, 9,5 % e 15 % (Figura 3). Settanni *et al* (2012) observaram que óleos essenciais contendo o limoneno como principal constituinte apresentou atividade antimicrobiana importante contra linhagens de *S. aureus* resistentes a antibióticos e algumas linhagens de *Salmonella entérica* e *Listeria monocytogenes*.

Os fatores bióticos e abióticos não poderiam ser indicados como interferentes do perfil químico em função de os clones avaliados serem expostos à mesma condição ambiental. Conseqüentemente, a diferença entre o perfil químico e a atividade antimicrobiana dos clones pode ser justificada pela ocorrência de variabilidade genética dentro das espécies.

Este resultado confirmam a importância da caracterização genotípica e fenotípica de clones que aroeira que possam vir a ser utilizados na indústria farmacêutica. A utilização de qualquer espécie florestal em programa de exploração industrial, inclusive farmacêutica, requer tecnologia de produção adequada, iniciada pela escolha adequada das árvores-matriz produtoras dos princípios ativos. Os critérios de seleção das árvores devem ser baseados na determinação das suas características genotípicas e fenotípicas (BRASIL, 2011).

A implantação de plantios comerciais, com genótipos e fenótipos conhecidos, a fim de abastecer a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia pode ser considerada uma alternativa promissora, pois viria a contribuir para a economia do país e,

considerando o aspecto ambiental, poderia promover a sustentabilidade de áreas nativas em função da redução das pressões antrópicas.

Supostamente a variabilidade genética implica em diversificação na síntese de compostos bioativos. Consequentemente pode alterar o comportamento antimicrobianos dos extratos das plantas. Souza (2012) avaliou a similaridade química de 15 indivíduos de aroeira situadas em uma mesma região de Sergipe, Alagoas, e observou similaridade química média de 42,53 %. A similaridade entre as plantas variou de 13 % a 90 %. Segundo os autores, o teste de Mantel demonstrou que a diversidade química dos indivíduos não pode ser explicada pela distância geográfica/condições edafoclimáticas, inferindo-se que o fator genético pode ser preponderante na composição química destes indivíduos.

RUAS (2016) observou que a adubação não interfere significativamente no perfil químico de aroeira. Os autores sugerem que a variação química observada entre as plantas está relacionada às suas características genéticas.

A diferença entre as composições químicas dos extratos de plantas de uma mesma espécie foi também demonstrada em clones de *Coriandrum sativum* (WEI *et al.*, 2019). Neste estudo, a variabilidade genética observada na espécie foi apontada como a principal causa da variação química e dos resultados da atividade antimicrobiana para as bactérias avaliadas.

Não foi observada diferença da atividade antimicrobiana entre os clones avaliados quando estes foram extraídos por meio do uso de solvente hidroetanólico (polar) (Tabela 6; Figura 10).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CLONES DE AROEIRA EM *Fusarium guttiforme*

4.2.1 Inibição *in vitro* de extratos hidroetanólicos de aroeira no crescimento micelial de *Fusarium guttiforme* – Técnica de Pour Plate.

O crescimento micelial de *F. guttiforme* em meio PDA foi significativamente inibido por extratos hidroetanólicos de aroeira de maneira dose-dependente - quanto maior a concentração de extrato, maior o PMGI (Figura 12, Figura 13). Este mesmo princípio foi observado por Salem *et al.*, (2021)

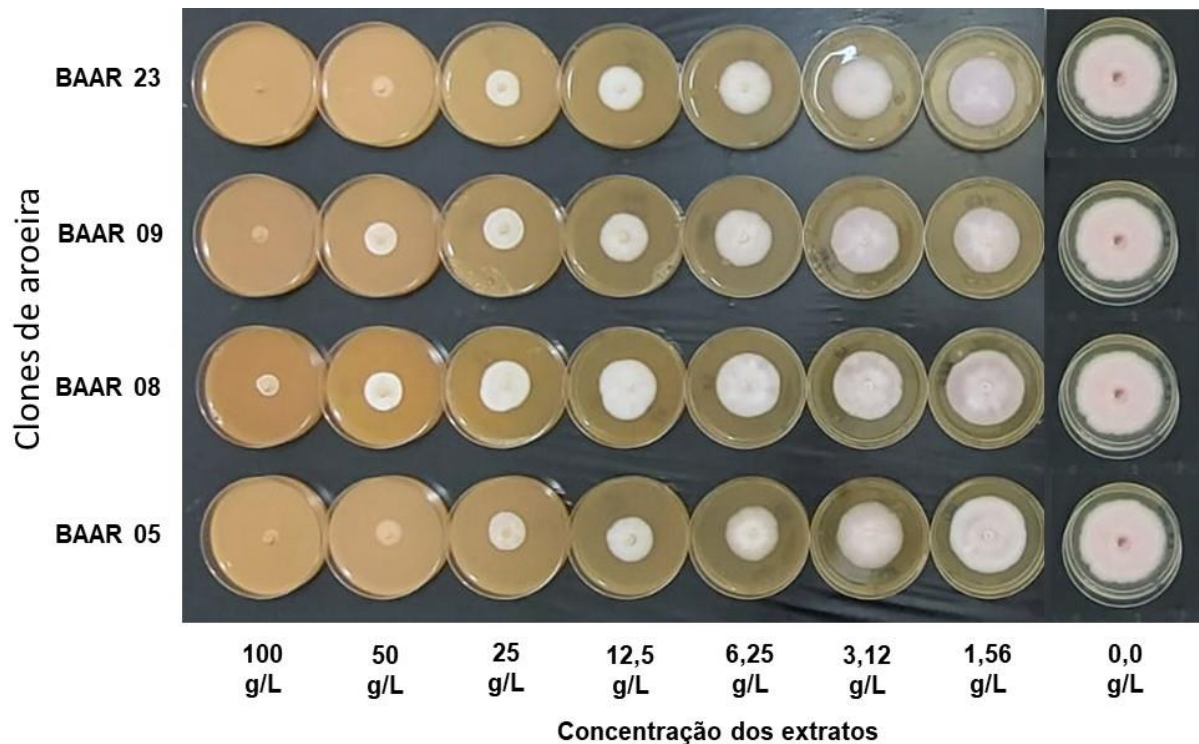


Figura 12 – Avaliação da atividade antifúngica de diferentes concentrações dos extratos hidrofílicos de clones de *S. terebinthifolia* (BAAR 5, BAAR 8, BAAR 9 e BAAR 23) para o fungo *F. guttiforme* (Sete dias de incubação, a 25 °C).

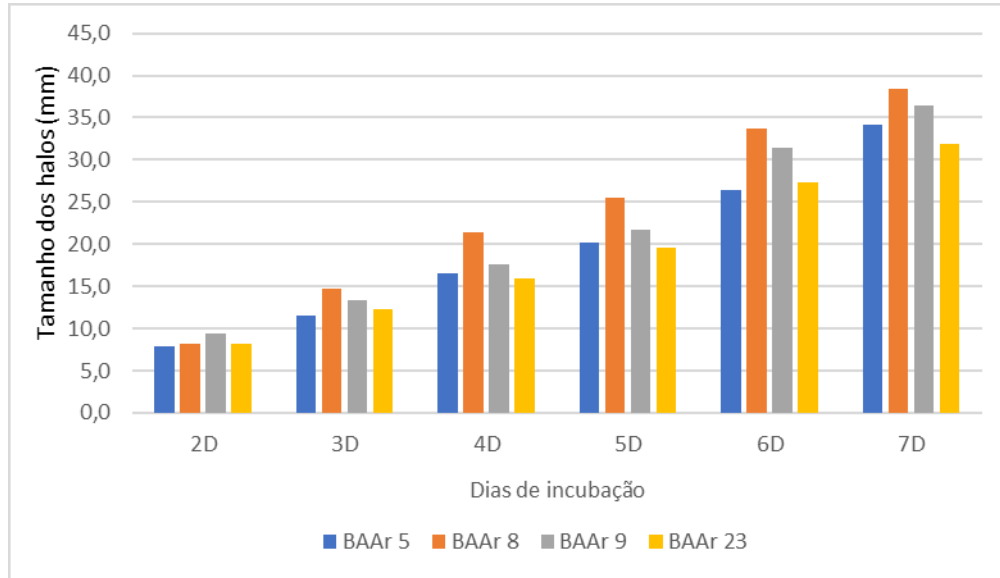


Figura 13 - Diâmetros das culturas (mm) de *F. guttiforme* cultivadas em meios suplementados com extratos hidroetanólicos de clones de aroeira por 7 dias (7D).

O diâmetro médio dos halos de crescimento do fungo *F. guttiforme* quando cultivado em meios suplementados com diferentes extratos hidroetanólicos de clones de aroeira, demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variáveis (Tabela 7 e Tabela 10; Figura 13).

Tabela 7 – Média dos diâmetros (mm) dos cultivos de *F. guttiforme* em meios suplementados com extratos hidroetanólicos de clones de aroeira.

Clones	Dias de incubação					
	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
BAAr 5	7,9	11,6	16,6	20,1	26,4	34,1
BAAr 8	8,1	14,7	21,4	25,4	33,7	38,4
BAAr 9	9,4	13,3	17,6	21,7	31,4	36,4
BAAr 23	8,1	12,3	15,9	19,6	27,3	31,9
CC	18	29	39	47	62	70

CC – Controle de crescimento (cultivo fúngico em ausência de extrato).

Os valores de MIC e MFC são indicadores importantes da capacidade inibitória dos agentes antifúngicos. Foram necessários 50 g L⁻¹ de extratos hidroetanólicos dos clones BAAr 5, BAAr 8 e BAAr 23 e 100 g L⁻¹ do clone BAAr 9 para inibir o crescimento micelial de *F. guttiforme* (MIC). A concentração fungicida mínima (MFC)

dos clones BAAr 5, BAAr 09 e BAAr 23 foi 100 g L⁻¹, enquanto a MFC do clone BAAr 8 foi maior do que 100 g L⁻¹ (Tabela 8).

Tabela 8 – MIC e MFC de extratos hidroetanólicos de clones de aroeira para *F. guttiforme*.

Concentração [g L ⁻¹]	Crescimento micelial no 2º dia				Crescimento micelial do 4º dia			
	BAAr 5	BAAr 8	BAAr 9	BAAr 23	BAAr 5	BAAr 8	BAAr 9	BAAr 23
100,0	-	-	-	-	-	+	-	-
50,0	-	-	+	-	+	+	+	+
25,0	+	+	+	+	+	+	+	+
12,5	+	+	+	+	+	+	+	+
6,25	+	+	+	+	+	+	+	+
3,12	+	+	+	+	+	+	+	+
1,56	+	+	+	+	+	+	+	+
	50 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹	100 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹	100 g L ⁻¹	> 100 g L ⁻¹	100 g L ⁻¹	100 g L ⁻¹
	MIC				MFC			

“+” presença de crescimento micelial; “-” ausência de crescimento micelial.

Quanto à capacidade de inibição do crescimento micelial (PMGI), a Tabela 9 e a Figura 14 apresentam a média do percentual de inibição fúngica promovida por extratos hidroetanólicos provenientes de quatro clones de aroeira. Uma análise de variância (Figura 14) mostrou que houve diferença significativa entre as variáveis ($p < 0,05$).

Após 72 h de incubação, 12,5 g L⁻¹ dos extratos hidroetanólicos dos clones BAAr 5, BAAr 9 e BAAr 23 inibiram mais de 50 % (PMGI) do crescimento micelial de *F. guttiforme*. Os clones BAAr 5, BAAr 8 e BAAr 23 inibiram totalmente o crescimento fúngico quando expostos a 50 g L⁻¹ de extrato (Tabela 10).

Tabela 9 - Média em mm do Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PMGI) de *F. guttiforme* por extratos hidroetanólicos de clones de aroeira.

Clones	Dias de incubação					
	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
BAAr 5	56,35	60,10	57,51	57,14	57,37	51,22
BAAr 8	54,76	53,69	45,05	45,90	45,62	45,10
BAAr 9	47,62	53,69	54,95	53,80	49,31	47,96
BAAr 23	54,76	61,58	59,34	58,36	55,99	54,49

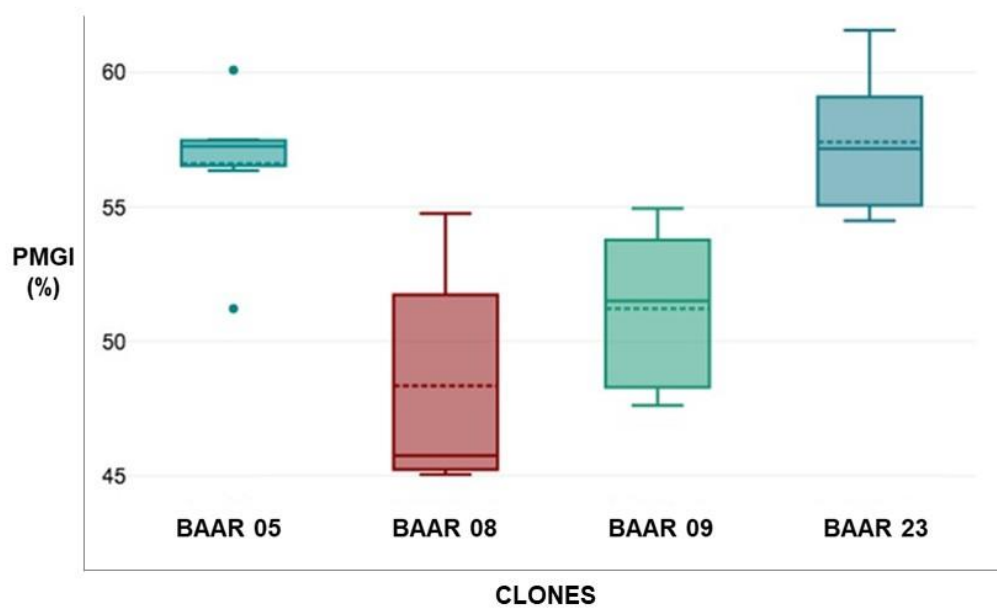


Figura 14 - Média em mm do Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PMGI) de *F. guttiforme* por extratos hidroetanólicos de clones de aroeira ($p < 0,05$). (Linha pontilhada = média do PMGI; linha contínua interna à caixa=mediana; pontos externos à caixa = *outlier*; linha em “T” externa à caixa = valores máximo e mínimo; tamanho da caixa = dispersão dos valores).

Os extratos hidroetanólicos do clone BAAR 5 demonstraram atividade inibitória similar ($p > 0,05$) ao clone BAAR 23, porém superior aos clones BAAR 8 ($p < 0,05$) e BAAR 9 ($p < 0,05$). Os clones BAAR 8 e BAAR 9 apresentaram atividade inibitória similar ($p > 0,05$) (Figura 14). A maior atividade inibitória dos clones BAAR 5 e BAAR 23 pode ser justificada pela maior proporção de limoneno e pineno quando comparado ao clone BAAR 8 (Figura 3). Os monoterpenos limoneno e pineno estão relacionados à elevada atividade antifúngica (CHEE *et al.*, 2009; HAMMER *et al.*, 2003).

A presença da quercetina galoil piranosídeo (Tabela 12) também poderia justificar a atividade antifúngica dos clones BAAR 5 e BAAR 23. Os flavonoides são metabólitos secundários, polifenólicos, reconhecidos por terem atividades biológicas variadas, como antifúngica (SRIVASTAVA *et al.*, 2022). Os estudos acerca dos mecanismos de ação demonstraram que muitos flavonoides causaram aumento de EROs, induziram apoptose e inibiram a formação de biofilme fúngico (JIN, 2019).

Tabela 10 – Efeito inibitório de extratos hidroetanólicos de clones de aroeira em *F. guttiforme*.

Amostra (Clone)	[g L ⁻¹]	Tempo de Incubação												
		48 h		72 h			4 dias		5 dias		6 dias		7 dias	
		Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	PMGI	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)
BAAr 5	100	18	0	29	0	100	39	0	47	0	62	0	70	9
	50	18	0	29	0	100	39	8	47	10	62	14	70	19
	25	18	8	29	8	72,4	39	9	47	13	62	20	70	28
	12,5	18	9	29	14	51,7	39	19	47	22	62	28	70	34
	6,25	18	11	29	16	44,8	39	21	47	26	62	33	70	41
	3,12	18	13	29	20	31,0	39	27	47	32	62	41	70	50
	1,56	18	14	29	23	20,7	39	32	47	38	62	49	70	58
	100	18	0	29	0	100	39	8	47	10	62	12	70	14
BAAr 8	50	18	0	29	0	100	39	9	47	13	62	21	70	25
	25	18	8	29	13	55,2	39	19	47	22	62	28	70	32
	12,5	18	10	29	17	41,4	39	24	47	28	62	37	70	42
	6,25	18	12	29	19	34,5	39	27	47	31	62	41	70	46
	3,12	18	13	29	21	27,6	39	29	47	34	62	45	70	51
	1,56	18	14	29	24	17,2	39	34	47	40	62	52	70	59
	100	18	0	29	0	100	39	0	47	0	62	9	70	12
	BAAr 9	50	18	8	29	10	65,5	39	10	47	13	62	19	70
25		18	9	29	11	62,1	39	13	47	17	62	26	70	31
12,5		18	10	29	14	51,7	39	19	47	23	62	31	70	36
6,25		18	12	29	18	37,9	39	24	47	29	62	39	70	44
3,12		18	13	29	19	34,5	39	26	47	32	62	44	70	51
1,56		18	14	29	22	24,1	39	31	47	38	62	52	70	59

(continua)

Tabela 10 – Efeito inibitório de extratos hidroetanólicos de clones de aroeira em *F. guttiforme*.

(continuação)

Amostra (Clone)	[g L ⁻¹]	Tempo de Incubação													
		48 h		72 h			4 dias		5 dias		6 dias		7 dias		
		Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	PMGI	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	Controle DC (mm)	Teste DT (mm)	
	100	18	0	29	0	100	39	0	47	0	62	0	70	0	
	50	18	0	29	0	100	39	8	47	10	62	14	70	17	
	25	18	8	29	8	72,4	39	9	47	13	62	21	70	26	
BAAr 23	12,5	18	10	29	13	55,2	39	16	47	20	62	28	70	33	
	6,25	18	12	29	17	41,4	39	23	47	27	62	35	70	40	
	3,12	18	13	29	19	34,5	39	26	47	31	62	42	70	48	
	1,56	18	14	29	21	27,6	39	29	47	36	62	51	70	59	

PMGI - Percentual de Inibição do Crescimento Micelial após 72h (DUARTE *et al.*, 2023)

DC - Diâmetro da colônia do controle de crescimento (ausência de extrato)

DT - Diâmetro da cultura fúngica para tratamento após 72h.

4.2.2 Efeito de extratos hidroetanólicos e hexânicos de aroeira no desenvolvimento de *Fusarium guttiforme*

Por meio da dispersão de extratos em superfície foi possível avaliar o desenvolvimento micelial de amostras extraídas com solventes polares (hidroetanólico) e das apolares (hexânico) (Tabela 11). O potencial hidrofóbico das amostras hexânicas não permitiu a realização da técnica de *pour plate* em função da utilização de meio de cultivo hidrofílico (Caldo Mueller Hinton).

A análise de variâncias (Anova) dos dados (Tabela 11; Figura 15) permitiu inferir que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variáveis PMGI de itraconazol, Hidroetanol e Hexano. A atividade antifúngica do extrato foi inferior à do antifúngico itraconazol. A comparação direta entre os extratos hidroetanólicos e hexânicos (Teste de Mann-Whitney) mostrou que a capacidade inibitória do extrato polar foi maior do que o extrato apolar ($p = 0,03$). A avaliação da atividade antibacteriana também demonstrou a maior capacidade antimicrobiana dos extratos obtidos por meio do uso de solventes polares.

De maneira geral os extratos polares de *S. terebinthifolia* são 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 (GOMES *et al.*, 2020).

Tabela 11 – Efeito inibitório no desenvolvimento de *F. guttiforme* de extratos hexânico e hidroetanólicos para clones de aroeira.

Clone	CP (Dc) (mm)	Controle DMSO (mm)	Controle		Extrato			
			Itraconazol		Hidroetanol		Hexano	
			Dt (mm)	PMGI inibição	Dt (mm)	PMGI inibição	Dt (mm)	PMGI inibição
BAAr 5	31	31	19	38,71	21	32,26	27	12,90
BAAr 8	31	31	19	38,71	26	16,13	28	9,68
BAAr 9	31	31	19	38,71	27	12,90	28	9,68
BAAr 23	31	31	19	38,71	25	19,35	28,5	8,06

PMGI - Percentual de Inibição do Crescimento Micelial após 72 h (DUARTE *et al.*, 2023)

Dc - Diâmetro da colônia do controle de crescimento (ausência de extrato);

Dt - Diâmetro da cultura fúngica para tratamento após 72h;

CP – Controle positivo; Controle

DMSO – Meio de cultivo suplementado com solvente de extrato hexânico (apolar).

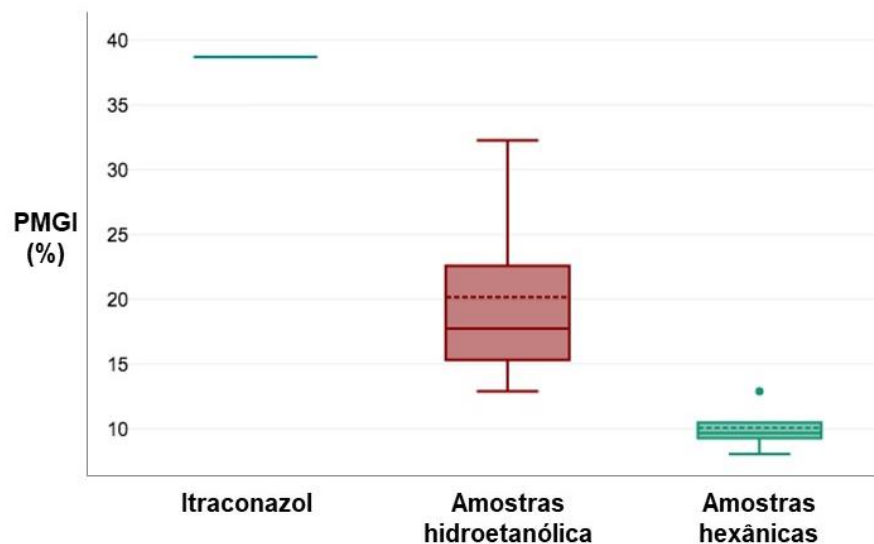


Figura 15 - Efeito inibitório no desenvolvimento de *F. guttiforme* de extratos hexânico e hidroetanólicos (200 mg mL^{-1}) e Itraconazol ($5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) para clones de aroeira. (Linha pontilhada = média do PMGI; linha contínua interna à caixa = mediana; pontos externos à caixa = *outlier*; linha em “T” externa à caixa = valores máximo e mínimo; tamanho da caixa = dispersão dos valores).

4.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (CLAD).

4.3.1 Avaliação cromatográfica dos extratos hidroetanólicos (polares)

O cromatograma das amostras dos clones BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9 e BAAr 23 extraídas por meio do solvente hidroetanólico está demonstrado na Figura 16. A verificação do tempo de retenção indica a similaridade entre os compostos presentes nos diferentes clones de aroeira. No entanto, entre os grupos químicos identificáveis pelo método, é possível observar maior abundância relativa de compostos no clone BAAr 5. A amostra BAAr 5 apresentou um pico (7) exclusivo que pode indicar a presença de substâncias produzidas apenas por este clone. Estes fatos podem justificar a maior atividade antimicrobiana (menores valores de MBC) deste clone (Tabela 6).

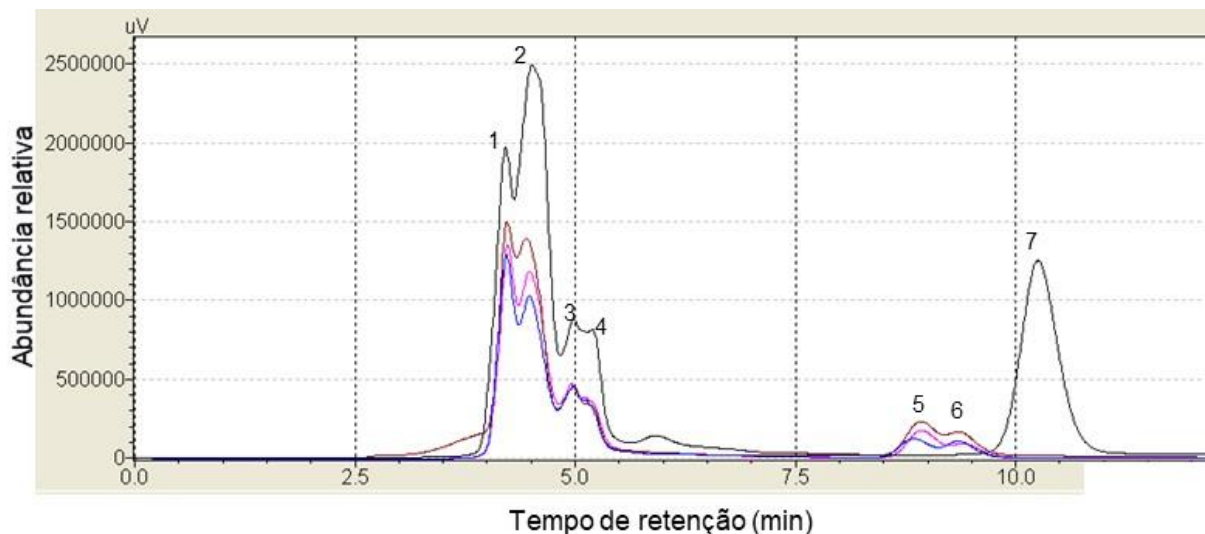


Figura 16– Perfil cromatográfico das amostras BAAr 5 (preto), BAAr 23(marrom), BAAr 8 (rosa), BAAr 9 (azul) extraídos com o solvente hidroetanól. (μV =microvolt). (Picos 1 a 7 = substâncias/grupos de substâncias em dado tempo de retenção).

4.3.2 Avaliação cromatográfica dos extratos hexânicos (apolares)

O cromatograma das amostras dos clones de aroeira BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9 e BAAr 23 extraídas por meio do solvente hexano está demonstrado na Figura 17. A verificação do tempo de retenção indica similaridade entre os compostos presentes nos diferentes clones de aroeira. Não foi possível observar coerência entre a variação da abundância relativa dos compostos e os resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana (MIC/MBC). Este fato pode ser justificado pela menor atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos apolares, como demonstrado neste estudo (Figura 15; Tabela 4)

Os cromatogramas dos extratos hexânicos apresentaram maior diversidade de picos em comparação aos extratos hidroetanólicos.

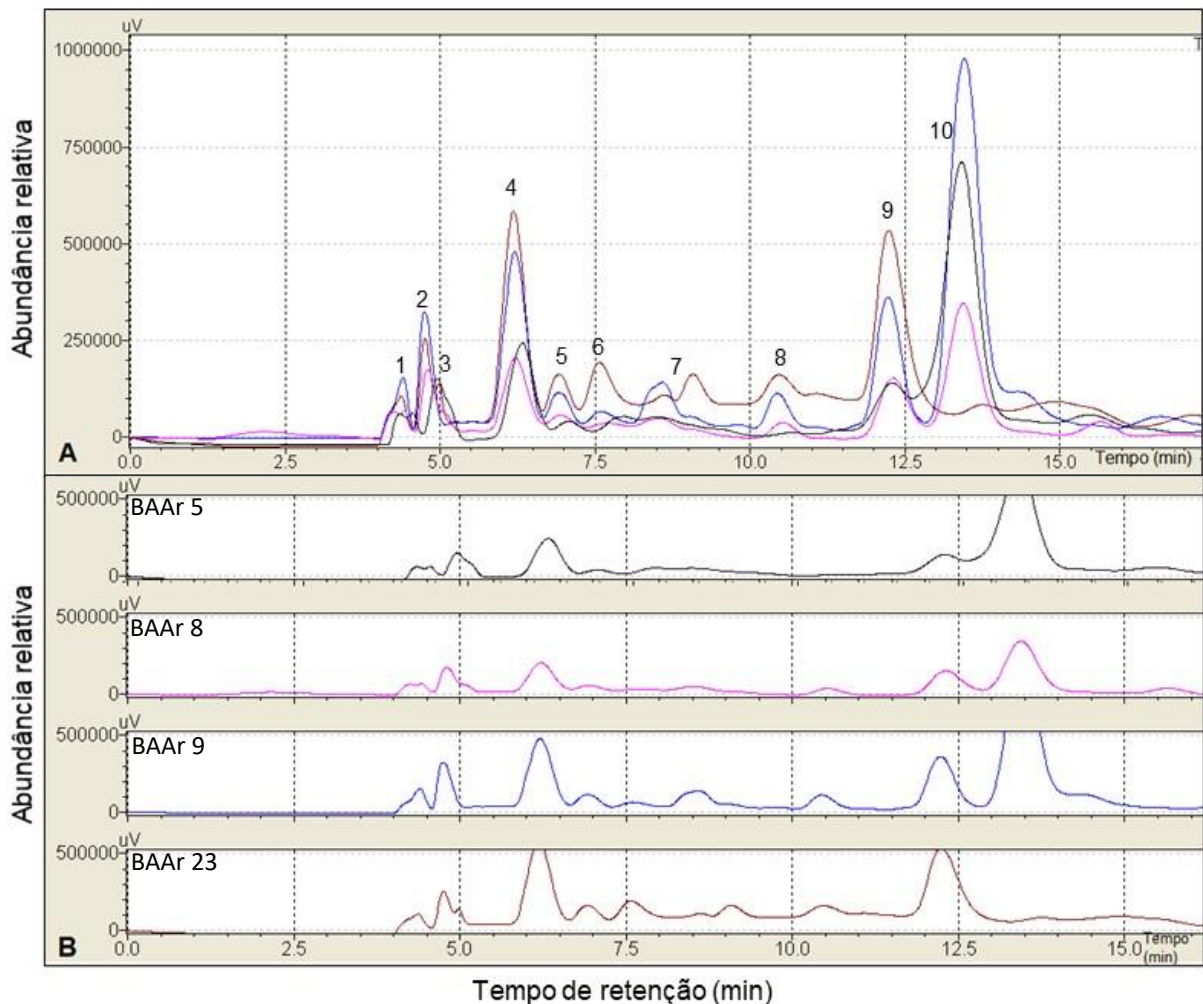


Figura 17– Perfil cromatográfico das amostras BAAr 5 (preto), BAAr 23(marrom), BAAr 8 (rosa), BAAr 9 (azul) extraídos com o solvente hexano. (μV =microvolt). (A) Perfis agrupados. (B) Perfis desagrupados. (Picos 1 a 10 = substâncias/grupos de substâncias nos diferentes tempos de retenção).

4.4 PERFIL QUÍMICO POR CG-EM DE EXTRATOS HEXÂNICOS DE CLONES DE AROEIRA

As análises dos perfis químicos por meio de CG-EM dos extratos hexânicos obtidos a partir de frutos maduros de quatro clones (BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9, BAAr 23) de aroeira geraram os cromatogramas dispostos na Figura 18.

Considerando exclusivamente os cromatogramas e dados obtidos em experimentos anteriores de extratos hexânicos desta mesma espécie vegetal, sob condições similares (BORGES et al., 2020), é possível verificar maior abundância de sesquiterpenos (RT 21-29 min) quando comparado aos monoterpenos (RT 9-20 min). Esses resultados são similares aos obtidos por Borges *et al.* (2020) em extratos de resíduos de aroeira. O uso de solvente hexano permitiu o isolamento de triterpenos e esteroides (RT 37-52 min), em maior abundância nos clones BAAr 5 e BAAr 9.

O método extrator interfere na composição da amostra. Quando o óleo essencial de frutos maduros de aroeira foi avaliado por CG-EM, observou-se maior concentração de monoterpenos (85,81 %), seguido pelos sesquiterpenos (5,34 %) (COLE et al., 2014). Todirascu-Ciornea *et al.* (2019) identificaram a presença de 95,71 % de monoterpenos e 0,68 % de sesquiterpenos em óleo essencial extraídos de frutos de aroeira. Em ambos os estudos não foi identificada a presença de triterpenos por meio do método utilizado (CG-EM).

Os picos que apresentaram maior abundância relativa (RT 26 min a 27 min; RT 28 min a 29 min) estão presentes nos cromatogramas dos quatro clones avaliados. Os clones BAAr 5 e BAAr 9 apresentaram alta concentração de picos de menor abundância relativa entre os RT 22 min e 25 min.

O extrato do clone BAAr 23 apresentou menor quantidade de sinais e as menores concentrações relativas dos picos. Por meio da verificação do perfil cromatográfico por CLAD (Figura 17) foi possível observar que o extrato hexânico da amostra BAAr 23 apresentou menor quantidade de picos quando comparada às outras amostras.

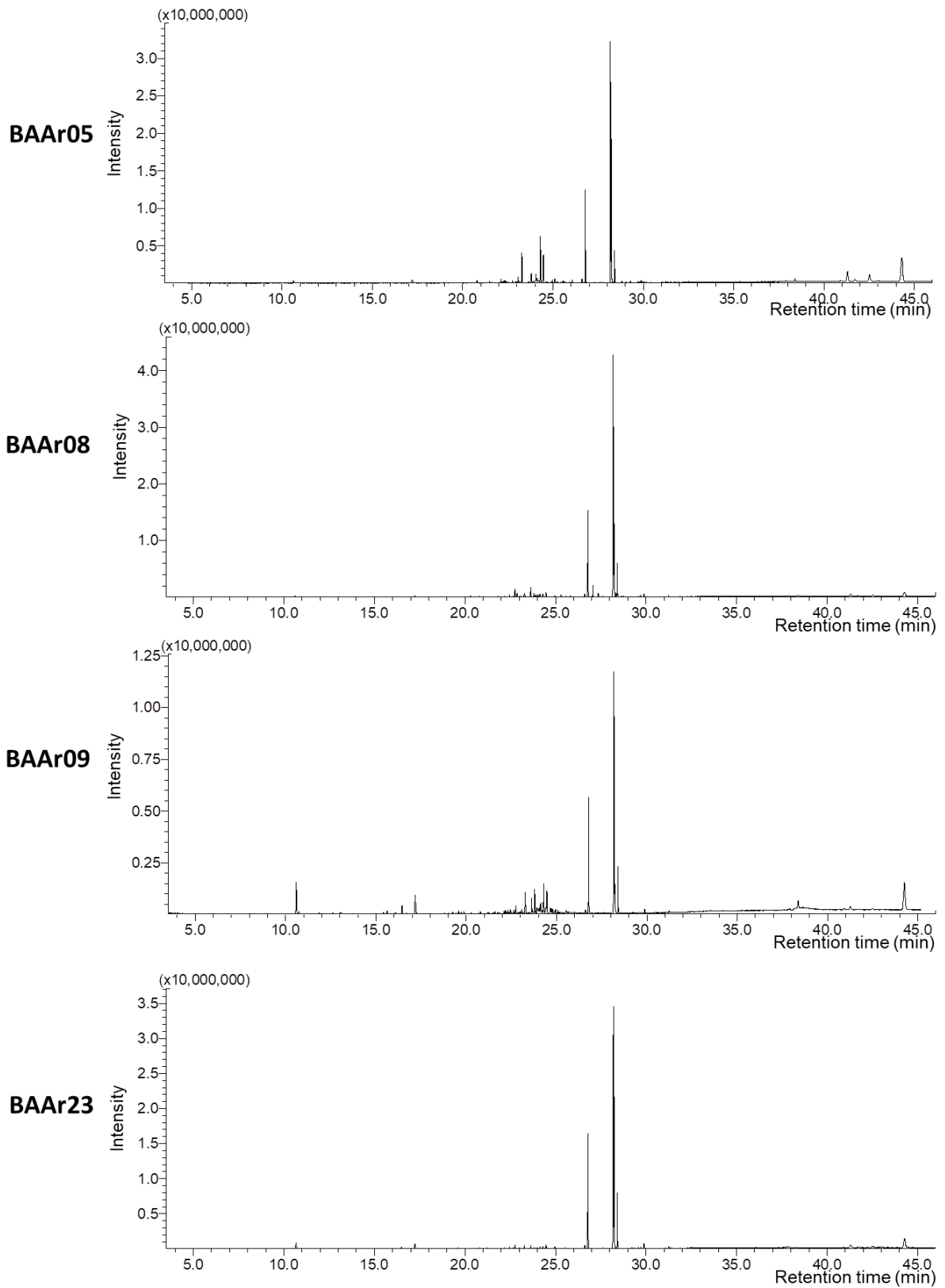


Figura 18 – Perfil cromatográfico por CG-EM para extratos hexânicos de quatro clones de *S. terbinthifolia* (BAAr 5; BAAr 8; BAAr 9; BAAr 23).

4.5 PERFIL QUÍMICO POR ESI(-) FT-ICR MS DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE CLONES DE AROEIRA

No espectro de massa obtido (Figura 19) a partir da análise de extrato hidroetanólico dos quatro clones de aroeira (BAAr 5, BAAr, 8, BAAr 9, BAAr 23) foi possível identificar a presença 29 íons compreendidas entre os m/z 195 e m/z 925 (Tabela 12).

O sinal que apresentou maior intensidade para os quatro clones de aroeira avaliados foi o de m/z 541, identificado como tetraidroamentoflavona e isômero tetraidrorobustaflavona (Figura 19).

A Tabela 12 apresenta as substâncias identificadas propostas presentes em cada clone de aroeira avaliado. A identificação foi proposta com base nos íons gerados, fórmula molecular, número de insaturações e anéis (DBE) e dados da literatura relacionados à identificação de substâncias no gênero avaliado, incluindo aqueles produzidos por este grupo de pesquisa.

Treze íons foram identificados em todos os quatro clones de aroeira. Quatro substâncias propostas identificadas (ácido digaloilquínico (m/z 495), ácido trigaloilchiquímico (m/z 629), trigaloilglicose (m/z 635), ácido anacárdico galoiletilado (m/z 651)) foram identificadas em apenas três clones.

Oito íons (etil galato (m/z 197), galoil glucopiranósido (m/z 439), ácido masticadienóico (m/z 453), m/z (573-não identificada), quercetina-galoil-piranósido (m/z 585), m/z (631-não identificada), tetra galoil glicose (m/z 787), pentagaloilglicose (m/z 939)) foram identificadas em apenas dois clones.

Os íons m/z 551 (não identificada) e m/z 579 (não identificada), m/z 615 (miricitrina O-galato), m/z 907 (cluster de ácido morônico) foram revelados em apenas um clone.

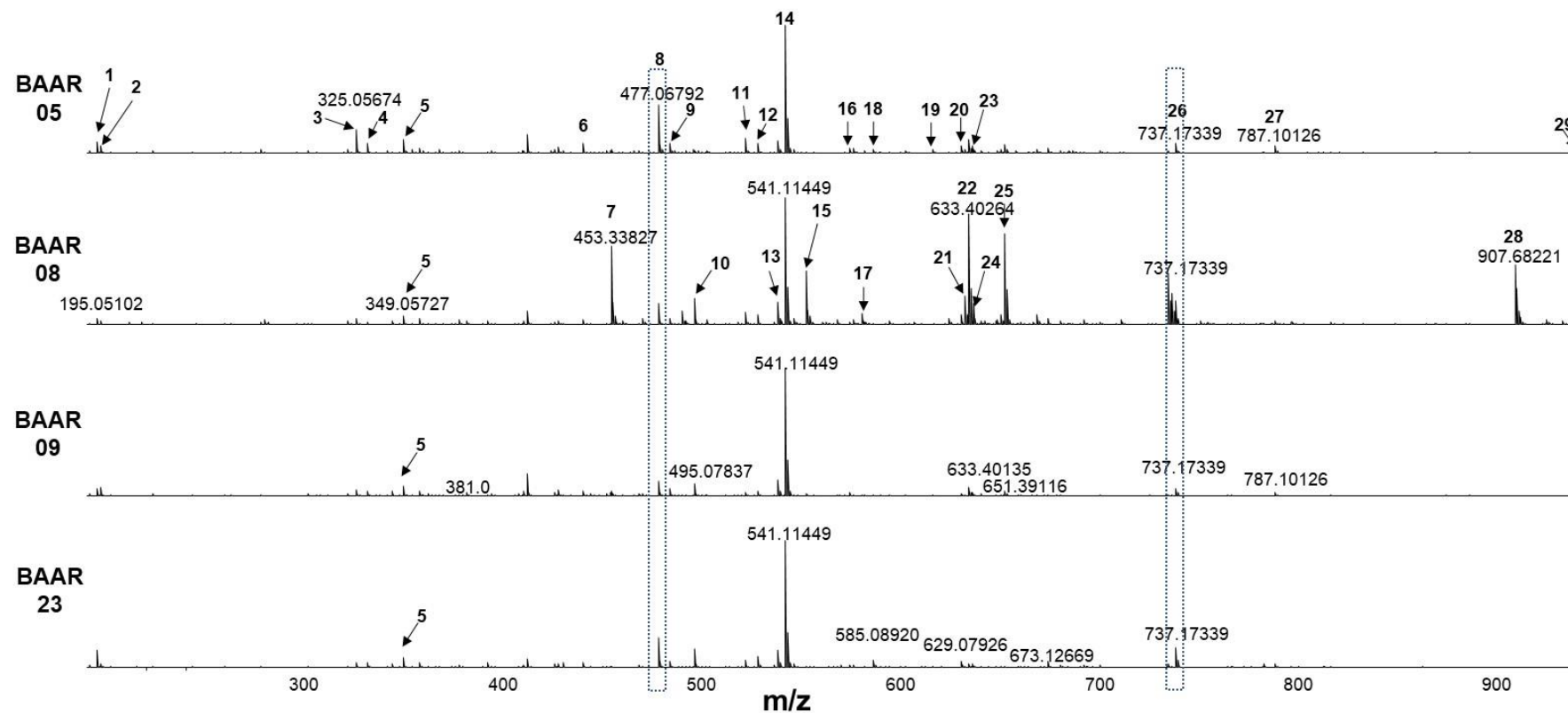


Figura 19 – ESI(-)FT-ICR MS para extrato hidroetanólico de clones de aroeira (BAAR 5; BAAR 8; BAAR 9; BAAR 23). Os retângulos pontilhados (íons 8 e 26) apontam exemplos de íons presentes em todos os clones avaliados.

Tabela 12 - Substâncias propostas a partir dos dados ESI(-)FT-ICR MS para os extratos hidroetanólicos dos frutos de clones de aroeira BAAr 5, BAAr 8, BAAr 9 e BAAr 23.

[M-H] ⁻ (m/z)	Clones				Fórmula molecular [M-H] ⁻	Error (PPM)	DBE ^a	Substâncias propostas	*Nº
	B5	B8	B9	B23					
195.05102	x	x	x	x	C ₆ H ₁₁ O ₇	0,04	1	Ácido glucônico	1
197.04577	x		x		C ₉ H ₉ O ₅	-0,23	5	Galato de etila	2
325.05672	x	x	x	x	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	-24	8	Ácido galoilchiquímico	3
331.06734	x	x	x	x	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	-0,82	6	Galoilglicose	4
349.05683	x	x	x	x	C ₁₆ H ₁₃ O ₉	-0,33	10	Éster digalato de etila	5
439.08629	x		x		C ₁₉ H ₁₉ O ₁₂	4,36	10	Galoil glicopiranosideo	6
453.33827		x	x		C ₃₀ H ₄₅ O ₃	-1,89	8	Ácido masticadienoico	7
477.06792	x	x	x	x	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃		13	Ácido galoilchiquímico	8
483.07853	x	x	x	x	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄	-1,03	11	Digaloilglicose	9
495.07837		x	x	x	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	-0,34	12	Ácido digaloilquínico	10
521.11537	x	x	x	x	C ₂₀ H ₂₅ O ₁₆	-1,08	8	Não identificada	11
527.12597	x	x	x	x	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₇	-1,13	6	Não identificada	12
537.08332	x	x	x	x	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	-1,13	22	Agatisflavona/amentoflavona	13
541.11449	x	x	x	x	C ₃₀ H ₂₁ O ₁₀		20	Tetrahydroamentoflavona ou tetraidrorobustaflavona	14
551.31493		x			C ₃₇ H ₄₃ O ₄	1,67	16	Não identificada	15
573.11625	x		x		C ₁₆ H ₂₉ O ₂₂	-1,21	2	Não identificada	16
579.34728		x			C ₃₉ H ₄₇ O ₄	1,21	16	Não identificada	17
585.08920	x			x	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₅	-1,04	17	Quercetina galoil piranosideo	18
615.09995	x				C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	-1,28	17	Miricitrina O-galato	19
629.07926	x		x	x	C ₂₈ H ₂₁ O ₁₇	-1,33	18	Ácido trigaloilchiquímico	20
631.38594	x	x			C ₃₆ H ₅₅ O ₉	-1,24	9	Não identificada	21
633.40135	x	x	x	x	C ₃₆ H ₅₇ O ₉	-1,38	8	Glicosídeo triterpeno	22
635.08978	x		x	x	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₈	-1,25	16	Trigaloilglicose	23
635.41729	x	x	x	x	C ₃₆ H ₅₉ O ₉	-1,32	7	Glicosídeo triterpeno	24
651.39116	x	x	x		C ₃₉ H ₅₅ O ₈	-1,41	12	Ácido anacárdico galoiletelado	25
737.17339	x	x	x	x	C ₃₆ H ₃₃ O ₁₇	-1,45	20	Não identificada	26
787.10126	x		x		C ₃₄ H ₂₇ O ₂₂	-1,66	21	Tetra-O-galoil hexosideo	27
907.68221		x			C ₅₃ H ₉₅ O ₁₁	-2,09	15	Cluster de ácido morônico	28
939.11240	x		x		C ₄₁ H ₃₁ O ₂₆	-1,72	26	Pentagaloilglicose	29

^aDouble bound equivalente (DBE).

*Número de identificação no espectro (Figura 19)

O maior número de íons foi observado no clone BAAr 5 de *S. terebinthifolia*. Vinte e quatro íons foram observados no clone BAAr 5, 20 (vinte) no BAAr 8, 23 (vinte e três) no BAAr 9 e 17 (dezessete) no BAAr 23 (Figura 20).

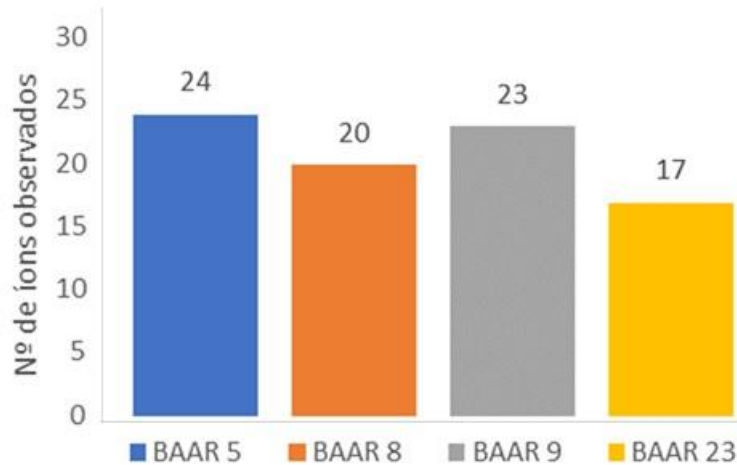


Figura 20 - Número de íons observados por ESI(-)FT-ICR MS em extratos hidroetanólicos de clones de aroeira.

Apesar de os clones de aroeira avaliados neste trabalho terem sido cultivados sob as mesmas condições (clima, localização, adubação, disponibilidade hídrica e manejo), foi possível verificar que a composição química variou (Tabela 12; Figura 20). A variação qualitativa de compostos bioativos pode justificar a diferença de atividade antibacteriana (Tabela 6) e antifúngica (Tabela 10) apresentada pelos clones.

Diversos estudos já foram realizados a partir de espécimes vegetais com a finalidade de buscar novas alternativas para o tratamento ou controle de doenças humanas, animais e vegetais. Foi possível observar 288 artigos científicos na base de dados Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) ao buscar, em janeiro de 2023, pelos termos “*hydroethanolic extract antimicrobial activity*”; 6.743 resultados ao buscar por “*essential oil antimicrobial activity*” e 58.838 resultados ao buscar por “*antimicrobial activity plants*”.

Porém, considerando os dados obtidos em nosso estudo, é pertinente questionar se os resultados dos estudos da atividade biológica, como antimicrobiana, antitumoral ou anti-inflamatória de certa amostra de planta poderia representar o potencial bioativo de um gênero ou espécie vegetal.

Conseqüentemente podemos inferir que a ausência de atividade biológica de uma amostra vegetal em um certo estudo científico poderia desmotivar a descoberta de atividade biológica de outra amostra dessa mesma espécie vegetal.

Os íons m/z 439 (galoil glicopiranosídeo), m/z 573 (não identificada), m/z 585 (quercetina galoil piranosídeo), m/z 615 (miricitrina O-galato), m/z 629 (ácido trigaloilchiquímico), m/z 631 (não identificado), m/z 635 (trigaloilglicose), m/z 651 (ácido anacárdico galoiletilado), m/z 787 (Tetra-O-galoil hexosídeo), m/z 939 (pentagaloilglicose) foram identificadas em BAAr 5 mas não foram identificadas em alguns clones analisados (Tabela 12).

Quanto a esses íons, Yu *et al.* (2020) mostraram atividade antifúngica marginal e relativamente alta de galoil glicopiranosídeo contra o fungo *Cryptococcus neoformans*, e nenhuma atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Quando avaliado contra a bactéria ORSA/MRSA, os resultados demonstraram que galoil glicopiranosídeo teve baixa atividade antibacteriana (CAO *et al* 2015).

As quercetinas, como a quercetina galoil piranosídeo, têm sido extensivamente estudadas entre os produtos naturalmente bioativos da família dos flavonoides devido às suas potentes atividades antioxidantes, anticancerígenas e antimicrobianas (ALIZADEH; EBRAHIMZADEH, 2022). A quercetina 2",6"-diacilgalactosídeo foi 512 vezes mais potente que a vancomicina contra cepas de *Enterococos* resistentes à vancomicina (VRE) (HOSSION *et al.*, 2011). Além de atividade antibacteriana e antifúngica, as quercetinas apresentaram diferentes atividades biológicas, como anticancerígena, antioxidante, antiinflamatória, anti-Alzheimer, antiviral, antitalassemia, antiobesidade, antidiabética, anti-hipertensiva, proteção cardiovascular, anti-Parkinson e antifosfolipase A2. Além disso, a quercetina exibiu efeito sinérgico com diferentes drogas ou compostos, como ceftazidima, amoxicilina, galato de epigalocatequina, menadiona, tricostatina A e 2-metoxiestradiol (ALIZADEH; EBRAHIMZADEH, 2022).

As miricitrina (Figura 21), como a miricitrina-O-galato, identificada apenas no clone BAAr 5, possui uma variedade de atividades biológicas, como efeitos antiinflamatório, antitumoral, antibacteriano, antiviral e antiobesidade. Exerce proteção cardiovascular, protege contra danos neurológicos e protege o fígado contra possíveis lesões (SONG *et al.*, 2021). Motlhatlego *et al.* (2020) demonstraram que a miricitrina foi ativa contra *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus* (MIC = 62,5 µg ml⁻¹ para todas as bactérias avaliadas).

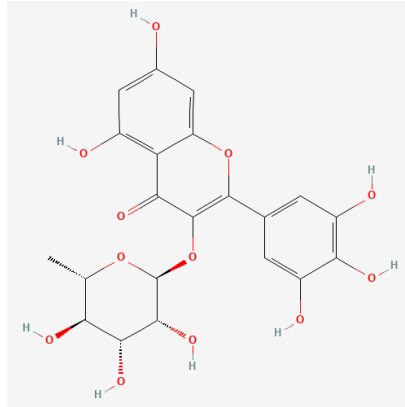


Figura 21 – Estrutura química da miricitrina (Fonte: PubChem, 2023).

Os taninos são metabólitos secundários polifenólicos em plantas superiores. Encontrados em uma ampla variedade de espécies, são considerados parte do sistema de defesa natural da planta contra estressores ambientais. Além da atividade antimicrobiana, possui atividade imunomoduladora, antioxidante e anticarcinogênica (CAO *et al.*, 2015). O pentagalolilglicose (PGG) (Figura 22) protege os hospedeiros animais da infecção por bactérias como *Staphylococcus aureus* (LIN *et al.*, 2011). PGG mostrou atividade antifúngica contra *Candida glabrata*, supostamente por meio de lesão às estruturas da parede celular fúngica (ZHAO *et al.*, 2015).

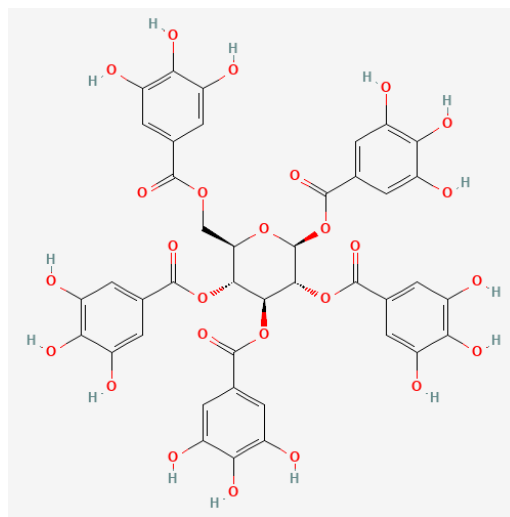


Figura 22 - Estrutura química do pentagalolilglicose (5 galoil periférico e uma glicose central) (Fonte: PubChem, 2023).

Jeong *et al.* (2021) demonstraram *in vitro* que o tetragaloil apresentou elevada atividade antimicrobiana isolado ou em combinação com antibióticos β -lactâmicos contra *S. aureus* resistentes à oxacilina (MRSA).

Vu *et al.* (2013) demonstraram o amplo espectro de atividade antibacteriana dos galotaninos, como o trigaloilglicose e tetragaloilglicose, contra várias bactérias fitopatogênicas Gram positivas e Gram negativas. Supostamente, a presença de ácido gálico inserido de maneira natural ou artificial (galoilação) em moléculas orgânicas está diretamente relacionada ao aumento das atividades biológicas das moléculas (KARAS *et al.*, 2017).

Os galotaninos, os compostos de galoilglicose e ácidos galoilchiquímicos também foram identificados como metabólitos presentes em resíduos de *S. terebinthifolia* (GOMES *et al.*, 2020). Nos frutos de aroeira também já foram identificados, compostos de galoilglicose, ácidos galoilchiquímicos (FEUEREISEN *et al.*, 2014, 2017; MUHS *et al.*, 2017).

Os dados espectrais demonstram a presença do galato de etila (m/z 197) no extrato hidroetanólico. Segundo Gomes *et al.* (2020), que também identificou esta molécula em extrato hidroetanólico de aroeira, a presença desse íon ocorreu em função da reação do solvente extrator (etanol) com alguma substância presente no extrato da planta.

A presença do íon m/z 325 foi verificado em todos os espectros analisados, indicando a possível formação do ácido galoilchiquímico. Em alguns extratos, a presença do dímero m/z 477 demonstra possivelmente a produção do ácido digaloilchiquímico (ALELUIA *et al.*, 2020).

A presença do íon m/z 325 e m/z 477 foi verificado em todos os espectros analisados, indicando a possível formação do ácido galoilchiquímico e ácido digaloilchiquímico. Diversos trabalhos evidenciam que *Schinus terebinthifolia* exibe uma variedade de compostos fenólicos. Estes compostos são os mais abundantes, sendo sintetizados principalmente pelas vias de ácido chiquímico, pentose fosfato e fenilpropanóide, que originam mais de 8.000 compostos (GOMES *et al.*, 2020).

O ácido quínico e seus derivados já foram encontrados em outras espécies da família Anacardiaceae. Remila *et al.* (2015), identificaram a presença do ácido digaloilquínico no extrato hidroalcolólico de folhas e frutos de *Pistacia lentiscus*.

Castro (2016) verificou a presença do ácido quínico e de seus derivados nos extratos hexânicos produzidos com a parte aérea de *Myracrodruon urundeuva*.

O ácido masticadienoico (m/z 453), pertencente à classe dos triterpenos, já foi identificado previamente em *S. terebinthifolia* (JAIN *et al.*, 1995; MORAIS *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2020). Estudando plantas naturais do Mediterrâneo, Karygianni *et al.* (2014) verificaram que extratos contendo triterpenos ácidos foram ativos no combate a bactérias orais.

Os biflavonoides agatisflavona ou seu isômero amentoflavona para m/z 537 e tetraidroamentoflavona ou seu isômero tetraidrorobustaflavona em m/z 541 já foram identificados previamente em aroeira. Diversos autores já descreveram a presença dessas substâncias nos frutos de *S. terebinthifolia* (BORGES *et al.*, 2020; FEUERISEN *et al.*, 2017; MUHS *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que amentoflavona inibe o crescimento de espécies Gram positivas, como *Enterococcus faecium*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus* e os microrganismos Gram-negativos como *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na faixa de $0,004 \text{ mg mL}^{-1}$ a $0,032 \text{ mg mL}^{-1}$ (HWANG *et al.*, 2013, KAIKABO *et al.*, 2009). A atividade antimicrobiana de tetraidroamentoflavona já foi demonstrada em bactérias Gram positivas como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus carnosus*. Essa molécula já apresentou uma considerável inibição do biofilme e redução no número de células ao avaliá-las frente a *Listeria innocua*, *S. carnosus* e *Pseudomonas putida* (LINDEN *et al.*, 2020; MUHS *et al.*, 2017; VIKRAM *et al.*, 2010). Tetraidroamentoflavona é um candidato promissor para a aplicação como agente antimicrobiano (LINDEN *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÃO

Os extratos polares e apolares provenientes de todos os clones de aroeira mostraram atividade antimicrobiana frente às bactérias multirresistentes avaliadas no estudo. Os resultados reforçam a possibilidade de compostos extraídos de aroeira

serem utilizados como agente antimicrobianos no combate a bactérias resistentes a antibióticos (ORSA/KPC).

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais varia em função do solvente utilizado. Os extratos obtidos por meio do uso de solução hidroetanólica como agente extrator apresentaram maior atividade antimicrobiana quando comparados àqueles obtidos por meio do uso de hexano como agente extrator.

Os extratos hexânicos e hidroetanólicos foram mais ativos em bactérias Gram positivas (ORSA) quando comparado a sensibilidade das bactérias Gram negativas (KPC).

O crescimento micelial de *F. guttiforme* foi inibido de maneira dose dependente por extratos hidroetanólicos de aroeira. O extrato do clone BAAr 5 demonstrou atividade inibitória similar ao clone BAAr 23, porém superior aos clones BAAr 8 e BAAr 9. Os clones BAAr 8 e BAAr 9 apresentaram atividade inibitória similar.

Os extratos polares apresentaram maior atividade inibitória para *F. guttiforme* do que os extratos apolares.

Os diferentes clones de aroeira apresentaram similaridade no perfil cromatográfico. Foi possível observar maior abundância relativa de picos no clone BAAr 5 quando extraído por meio do solvente hidroetanólico. O cromatograma dos clones extraídos por meio do solvente hexano apresentaram maior diversidade de picos. Além disso, demonstrou variação na abundância relativa dos compostos.

A espectrometria por meio de ESI(-)FT-ICR MS identificou a presença de 29 íons, compreendidos entre os m/z 195 e m/z 925 nos clones avaliados. O clone BAAr 5 apresentou o maior número de íons. Vinte e quatro íons foram observados neste clone, 20 no clone BAAr 8, 23 no clone BAAr 9 e 17 no clone BAAr 23. Apesar de os clones de aroeira terem sido cultivados sob as mesmas condições edafoclimáticas, apresentaram variação qualitativa e quantitativa de compostos bioativos identificados. A miricitrina foi detectada apenas no clone BAAr 5.

Os clones avaliados apresentaram perfil fitoquímico, atividade antibacteriana e atividade antifúngica distinta. Infere-se que a variação observada pode estar relacionada às características genéticas das plantas. Sugere-se que o uso dos extratos de aroeira para fins microbiológicos deve ser proveniente de plantas previamente selecionadas e clonadas, que apresentem as características desejadas,

que poderão ser registradas ou protegidas no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura (RNC/MAPA).

REFERÊNCIAS

ALAKLOBI, F.; ALJOB AIR, F.; ALRASHOD, A. The prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among outpatient children in a tertiary hospital: a prospective observational study in Riyadh, Saudi Arabia. **Intl. J. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 2, p. 136–140, 2015.

ALELUIA, R. L. **Análise da composição química e das atividades biológicas de *Schinus terebinthifolia* raddi (aroeira) submetida a diferentes tipos de adubação.** 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo. (UFES). Vitória, ES, 2020.

ALGAMMAL, A. M.; HETTA, H. F.; ELKELISH, A.; ALKHALIFAH, D. H.; HOZZEIN, W. N.; BATIHA, G. E.; EL NAHHAS, N.; MABROK, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infect. and Drug Resist.**, v.13, p. 3255, 2020.

ALIZADEH, S. R.; EBRAHIMZADEH, M. A. O-Glycoside quercetin derivatives: biological activities, mechanisms of action, and structure-activity relationship for drug design, a review. **Phytother. Res.**, v.32, n. 12, p. 778–807, 2022.

ATOUM, M.F.; AKEL, H.; BATTIKHI, M.N. Comparison of PCR and disc diffusion methods in detecting methicillin resistance among *Staphylococcus* species from nosocomial infections. **Saudi Med J.**, v. 24, p. 1410–1412, 2003.

AZARIAN, T. E. Intrahost evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 among individuals with reoccurring skin and soft-tissue infections. **J. Infect. Dis.**, v. 214, p. 895–905, 2016.

AZEEZ-AKANDE O. Global trend of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and emerging challenges for control. **African J. Clin. Exp. Microbiol.**, v. 11, 2010.

BAE, J.; KIM, N.; SHIN, Y.; KIM, S.; KIM, Y. Activity of catechins and their applications. **Biomed. Derm.**, 2020.

BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S.F. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research.**, v.196, p. 44-68, 2017.

BARRASA-VILLAR, J. I.; AIBAR-REMÓN, C.; PRIETO-ANDRÉS, P. Impact on Morbidity, Mortality, and Length of Stay of Hospital-Acquired Infections by Resistant Microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, v. 65, p. 644–652, 2017.

BEN-DAVID, D.; KORDEVANI, R.; KELLER, N.; TAI, I.; MARZEL, O.; GAL-MOR, Y. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18, n. 1, p. 54–60, 2017.

BOO, Y. C. p-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: a review focusing on its antimelanogenic effects. **Antioxidants**, v.8, p. 275, 2019.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O., COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 396–402, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema Nacional de Sementes e Mudas. **Legislação brasileira sobre sementes e mudas**: Lei nº 10.711, de 5 de Agosto de 2003, Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004 e Instrução Normativa nº 56 de 8 de dezembro de 2011, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Programa Nacional de Bioinsumos**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos>. Acesso em: 22 nov. 2022.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiolog.**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CAO, F.; PENG, W.; LI, X.; LIU, M.; LI, B.; QIN, R.; JIANG, W.; CEN, Y.; PAN, X.; YAN, Z. Emodin is identified as the active component of ether extracts from *Rhizoma Polygoni Cuspidati*, for anti-MRSA activity. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 93, p. 485–493, 2015. doi:10.1139/cjpp-2014-0465

CASTRO, C. B. Perfil químico e atividade citotóxica de extratos de folha, galho e casca de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*): abordagem metabólica e quimiométrica. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**. Universidade Federal do Ceará –UFC. 2016.

Centers for Disease Control and Prevention. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, [2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>. Acesso em 10 ago. 2021.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; REYES-DE-CORCUERA, J. I.; ETXEBERRIAA, E.; DANYLUKA, M. D.; RODRICK, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science & Technology.**, v. 20, p. 557-566, 2009.

CHANG, F. R.; HSIEG, Y. C.; CHANG, Y.F.; LEE, K.H. Inhibition of the Epstein–Barr virus lytic cycle by moronic acid. **Antiviral Research.** v. 85, p. 490–495, 2010.

CHEE, H. Y.; KIM, H.; LEE, M. H. *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. **Mycobiology**. v. 37, p. 243-246, 2009.

CHEN C., WAN C., PENG X. A flavonone pinocembroside inhibits *Penicillium italicum* growth and blue mold development in 'Newhall' navel oranges by targeting membrane damage mechanism. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 165, p. 104505, 2020. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.11.025.

CLARRIDGE, J. E.; HARRINGTON, A. T.; ROBERTS, M. C.; SOGE, O. O. & MAQUELIN, K. Impact of strain typing methods on assessment of relationship between paired nares and wound isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, p. 224–231, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Screening and Confirmatory Tests for Suspected Carbapenemases Production. 20 **supplemental table 2A-S2**, 2010.

COLE, E. R.; SANTOS, R. B.; LACERDA JÚNIOR. V.; MARTINS, J. D.; GRECO, S. J.; CUNHA NETO, A. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, p. 821–828, 2014.

COSARCĂ, S.; TANASE, C.; MUNTEAN, D. L. Therapeutic aspects of catechin and its derivatives—an update. **Acta Biol. Marisiensis**. v.2, n. 1, p. 21–29, 2019

COUTINHO, I. H. I. L. S.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, K. E. F.; COELHO, K. C. U.; STAHLKE JÚNIOR, H. J.; AGULHAM, M. A.; BACHLE, E. CAMARGO, P. A. M.; PIMENTEL, S. K.; TEIXEIRA DE FREITAS, A. C. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**., v. 21, s. 3, 2006.

CRAFT, K. M.; NGUYEN, J. M.; BERG, L. J.; TOWNSEND, S. D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-Resistance and the Biofilm Phenotype. **Med. Chem. Commun.**, v. 14, n.10(8), p. 1231-1241, 2019.

CREECH, C. B.; AL-ZUBEIDI, D. N.; FRITZ, S. A. Prevention of Recurrent *Staphylococcal* Skin Infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 29, n. 3, p. 429–464, 2015.

DANNENBERG, G. S.; FUNCK, G. D.; SILVA, W. D.; FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**., v. 95, p. 115–120, 2019.

DETTWEILER, M.; MARQUEZ, L.; LIN, M.; SWEENEY-JONES, A. M.; CHHETRI, B. K.; ZURAWSKI, D. V.; KUBANEK, J.; QUAVE, C.L. Pentagalloyl glucose from *Schinus terebinthifolia* inhibits growth of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Sci Rep.**, v.10, p. 15340, 2020.

DUARTE, J. A.; DA SILVA, G. A. R.; MACHADO, F. P.; FOLLY, D.; PEÑALOZA, E.; GARRETT, R.; SANTOS, M. G.; VENTURA, J. A.; WERMELINGER, G. F.; ROBBS, B. K.; ROCHA, L.; FIAUX, S. B. Glimpsing the chemical composition and the potential of Myrtaceae plant extracts against the food spoilage fungus *Thielaviopsis ethacetica*. **Food Control**, v. 146, 2023.

DWIBEDI, V.; SAXENA, S. In vitro anti-oxidant, anti-fungal and anti-staphylococcal activity of resveratrol-producing endophytic fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.** v.90, n.1; p. 207–219, 2019.

EELLS S. J. Persistent environmental contamination with USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogenic strain types in households with *S. aureus* skin infections. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 35, p. 1373–1382, 2014.

ELSHAFIE, H. S.; GHANNEY, N.; MANG, S.; 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.**, v. 19, p. 266-273, 2016.

ENNIGROU, A.; CASABIANCA, H.; LAARIF, A.; HANCHI, B.; HOSNI, K. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. **South African Journal of Botany.**, v. 108, p. 407-415, 2017.

EZHIL I.; LAKSHMI T.; Antibacterial efficacy of epicatechin and rutin from *Acacia catechu* leaf extract against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* - An in vitro study. **Journal of Advanced Pharmacy Education and Research.** v. 7, l. 1, p. 22-241, 2017.

FERREIRA, P. G.; FERRAZ, A. C.; FIGUEIREDO, J. E.; LIMA, C. F.; RODRIGUES, V. G.; TARANTO, A. G.; FERREIRA, J. M. S.; BRANDÃO, G. C.; VIEIRA-FILHO, S. A.; DUARTE, L.P.; MAGALHÃES, C. L. B.; MAGALHÃES, J.C. Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. **Arch. Virol.**, v.163, p. 1567–1576, 2018.

FEUEREISEN, M. M., HOPPE, J., ZIMMERMANN, B. F., WEBER, F., SCHULZE-KAYSERS, N., SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 6219–6226, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf500977d>.

FEUEREISEN, M. M., ZIMMERMANN, B. F., SCHULZE-KAYSERS, N., SCHIEBER, A., 2017. 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.**, v. 65, p. 5330–5338, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00480>

FRANK, D. N.; FEAZEL, L. M.; BESSESEN, M. T.; PRICE, C. S.; JANOFF, E. N.; PACE, N. R. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. **PLoS One.**, v. 5, n. 5, p. 10598, 2010.

GAJDACS, M.; ZSOLDINÉ URBÁN, E. Epidemiology and resistance trends of *Staphylococcus aureus* isolated from vaginal samples: a 10-year retrospective study in Hungary. **Acta Dermatovenerol Alp. Pannonica Adriat.**, v. 28, p. 143–147, 2019.

GERHARDT, N. S. **Avaliação da qualidade dos frutos de genótipos de aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) em diferentes estádios de maturação.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Centro de Ciências Humanas e Naturais. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Vitória, ES, 2016.

GINDRI, D. M.; MOREIRA, P. A. B.; VERISSIMO, M. A. A. Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável. Ed. 1. Florianópolis: **CIDASC**, p. 486, 2020.

GOMES, R. B. A.; DE SOUZA, E. S.; BARRAQUI, N. S. G.; TOSTA, C. L.; NUNES, A. P. F.; SCHUENCK, R. P.; RUAS, F. G.; VENTURA, J. A.; FILGUEIRAS, P. R.; KUSTER, R. M. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. **Industrial Crops & Products.**, v. 143, 2020.

GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev. Cuba. Plantas Med.**, v. 5, p. 23–25, 2000.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 853-860, 2003.

HOSSION, A. M.; ZAMAMI, Y.; KANDAHARY, R. K.; TSUCHIYA, T.; OGAWA, W.; IWADO, A.; & SASAKI, K. Quercetin diacylglycoside analogues showing dual inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV as novel antibacterial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3686–3703, 2011.

HOSTETTMANN-KALDAS, M.; NAKANISHI, K. Moronic acid a simple triterpenoid ketoacid with antimicrobial activity Isolated from *Ozoroa mucronata*. **Planta Medica**, v.37, p.358–360, 1979.

HWANG, J. H.; CHOI, H.; WOO, E. R.; LEE, D. G. Efeito antibacteriano da amentoflavona e seu efeito sinérgico com antibióticos. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 953 – 958, 2013.

IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp. 2020.

INOUE, Y.; SHIRAISHI, A.; HADA, T.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of myrcene on *Staphylococcus aureus* and its role in the essential oil of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*). **Natural Medicines**, v. 1, p. 10–14, 2004.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, F.; DEMIRCI, B.; NOMA, Y.; BASER, K. H. Biotransformation of (-)-(R)-alpha-phellandrene: antimicrobial activity of its major metabolite. **Chem Biodivers**. v.9, p. 1525-1532, 2012.

ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. H. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Product**, v.64, p. 1278–1281, 2001.

JAIN, M. K.; YU, BAO-ZHU, ROGERS, J. M.; SMITH, A. E.; BOGER, E. T. A.; OSTRANDER, R. L.; RHEINGOLD, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 537–547, 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00960-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00960-2).

JEONG, E. T.; PARK, S. K.; JO, D. M.; KHAN, F.; CHOI, T. H.; YOON, T. M.; KIM, Y. M. Synergistic Antibacterial Activity of an Active Compound Derived from *Sedum takesimense* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Its Clinical Isolates. **J Microbiol Biotechnol.**, v. 28, n. 31(9), p. 1288-1294, 2021.

JESUS, W. M. M.; CUNHA, T. N. Estudos das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Mytenusilicifolia* Mart. ExReissek) e de suas espécies adulterantes. **Ver Saúde Desenvolvimento**, v. 1, p. 20-24, 2012.

JIN, Y. S. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives, **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 19, 2019

KAIKABO, A. A.; SAMUEL, B. B.; ELOFF, J. N. Isolation and activity of two antibacterial biflavonoids from leaf extracts of *Garcinia livingstonei* (Clusiaceae). **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1363-1366, 2009.

KARAS, D.; ULRICHOVÁ, J.; VALENTOVÁ, K. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.105, p. 223-240, 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 Res.**, Int. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/839019>.

KORRES, A. M. N.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. **Fungal Biology**, v. 115, Issue 12, 2011

KUROKAWA, M.; BASNET, P.; OHSUGI, M.; HOZUMI, T.; KADOTA, S.; NAMBA, T.; KAWANA, T.; SHIRAKI, K. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified

from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 72–78, 1999.

KWEKA, E J.; NYINDO, M.; MOSHA, F.; SILVA, A. G. Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 129, 2011.

LEE, J.; OH, M.; SEOK, J. H.; KIM, S.; LEE, D. B.; BAE, G.; BAE, H.; BAE, S. Y.; HONG, Y.; KWON, S.; LEE, D. H.; SONG, C. S.; MUN, J. Y.; CHUNG, M. S.; KIM, K. H. Antiviral effects of black raspberry (*Rubuscoreanus*) seed and its gallic acid against influenza virus infection. **Viruses**, v.8, p. 157, 2016.

LEE, O.H.; LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, n.101, p. 3751–3754, 2010.

LINDEN, M.; BRINCKMANN, C.; FEUEREISEN, M. M.; SCHIEBER, A. Effects of structural differences on the antibacterial activity of biflavonoids from fruits of the Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Food Research International**, v.133, 09134, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109134>.

LIN, M.H.; CHANG, F. R.; HUA, M.Y.; WU, Y.C.; LIU, S. T. Inhibitory effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 55, p. 1021–1027, 2011.

LIN, S. C.; HO, C. T.; CHUO, W. H.; LI, S.; WANGS, T. T.; LIN, C. C. Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. **BMC Infect. Dis.**, v.17, p. 144, 2017

MACEDO-VIÑAS, M.; DE ANGELIS, G.; ROHNER, P. Burden of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections at a Swiss University hospital: excess length of stay and costs. **Journal of Hospital Infectio.**, v. 84, p. 132-137, 2013.

MEYER, M.C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S.M.; SILVA, J. C. Bioinsumos na cultura da soja. Brasília, DF: **Embrapa**, p. 550, 2022.

MOHD, A.; ZAINAL, N.; TAN, K.; ABUBAKAR, S. Resveratrol effects Zika virus replication in vitro. **Sci. Rep.**, v. 9, p.14336, 2019.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.53, p. 333–334, 2009.

MORAIS, T. R.; DA COSTA-SILVA, T.A.; TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S. E. T.; SCOTTI, M. T.; DE SOUSA, R. M. F.; ARAUJO, A. C. C.; DE OLIVEIRA, A.; DE MORAIS, S. A. L.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/activity relationships. **Molecules**, v. 19, p. 5761–5776, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules19055761>.

MOTLHATLEGO, K. E.; ABDALLA, M. A.; LEONARD, C. M.; ELOFF, J. N.; MCGAW, L. J. Inhibitory effect of Newtonia extracts and myricetin-3-o-rhamnoside (myricitrin) on bacterial biofilm formation. **BMC Complement Med Ther.**, v. 23, n. 20(1), p. 358, 2020.

MO, Y.; LOW, I.; TAMBYAH, S.K.; TAMBYAH, P.A. The socio-economic impact of multidrug-resistant nosocomial infections: a qualitative study. **J. Hosp. Infect.**, v.102, n. 4, p. 454-460, 2019.

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.**, v. 7, p. 1–15, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42275>

MUSARRA-PIZZO, M.; GINESTRA, G.; SMERIGLIO, A.; PENNISI, R.; SCIORTINO, M. T.; MANDALARI, G. The antimicrobial and antiviral activity of polyphenols from almond (*Prunusdulcis* L.) **Skin. Nutrients.** v.11, p. 2355, 2019.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n.12, p. 1451–1474, 2013.

NGUEFACK, J.; TAMGUE, O.; DONGMO, J. B. L.; DAKOLE, C. D.; LETH, V., VISMER, H. F. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 377–383, 2012.

NJOUNGANG, L. L.; NWOBEGAHAY, J. M.; AYANGMA, C. R.; NJUKENG, A. P.; KENGNE, M.; ABENG, E. M. Prevalence and antibiotic resistance patterns of strains of *Staphylococcus aureus* isolated at the Yaounde Military Hospital, Cameroon. **Microbiol. Res. Int.**, v.3, n. 4, p. 56–63, 2015.

OKOCHE, D.; ASIIMWE, B. B.; KATABAZI, F. A.; KATO, L.; NAJJUKA, C. F. Prevalence and Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Mulago National Referral Hospital, Uganda. **PLoS ONE.**, v. 10, n. 8, e0135745, 2015.

OLIVEIRA, L. F. M.; OLIVEIRA, L. F. G.; SANTOS, M. C.; NARAIN, N.; LEITE NETA, M.T.S. Tempo de destilação e perfil volátil do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*) em Sergipe. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.16, n. 2, p. 243-249, 2014.

OLIVEIRA, M. B. S.; VALENTIM, I.B.; ROCHA, T. S.; SANTOS, J. C.; PIRES, K. S. N.; TANABE, E. L. L.; BORBELY, K. S. C.; BORBELY, A. U.; GOULART, M. O. F. *Schinus terebinthifolius* Raddi extracts: from sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant. **Ind. Crops and Products.**, v.152, p. 112503, 2020.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations. **Review On Antimicrobial Resistance**, 2016.

OPAS/OMS- BRASIL. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. 2017. Disponível: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812. Acesso: 8 jan 2020.

OZCELIK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharm. Biol.**, v. 49, n.4, p. 396–402, 2010.

PARIMALA, M.; SHOBA, F. G. *In vitro* antimicrobial activity and HPTLC analysis of hydroalcoholic seed extract of *Nymphaea nouchali* Burm. f. **Compl. and Altern. Med.** v.14, p. 314-361, 2014.

PATEL, G.; BONOMO, R.A. Stormy waters ahead: Global emergence of carbapenemases. **Front. Microbiol.**, v. 4, p. 1–17, 2013.

PEI, K.; OU, J.; HUANG, J.; OU, S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **J. Sci. Food Agric.**, v. 96, p. 2952–2962, 2015.

PÉREZ-LÓPEZ, A.; CIRIO, A. T.; RIVAS-GALINDO, V. M.; ARANDA, R. S.; DE TORRES, N. W. Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the Essential Oil and δ -Cadinene Isolated from *Schinus mole* Fruit. **J. Essent. Oil Res.**, v. 23, p. 25–28, 2011.

PEROVIC, O.; IYALOO, S.; KULARATNE, R.; LOWMAN, W.; BOSMAN, N.; WADULA, J. Prevalence and Trends of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia in Hospitalized Patients in South Africa, 2010 to 2012: Laboratory-Based Surveillance Mapping of Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology. **PLoS One**, v. 10, n. 12, e0145429, 2015.

PIRAS, A.; MARZOUKI, H.; FALCONIERI, D.; PORCEDDA, S.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Chemical Composition and Biological Activity of Volatile Extracts from Leaves and Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi from Tunisia. **Records of Natural Products**, v. 11, n. 1, 2017a.

PIRAS, A.; MARZOUKI, H.; MAXIA, A.; MARENGO, A.; PORCEDDA, S.; FALCONIERI, D.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Chemical characterization and biological activity of leaf essential oils obtained from *Pistacia terebinthus* growing wild in Tunisia and Sardinia Island. **Natural product research**, v. 31, n. 22, p. 2684-2689, 2017.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.

PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J. C. The epidemiology, evolution, and treatment of KPC-producing organisms. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 20, p. 13, 2018.

PRAKASH, M.; BASAVARAJ, B. V.; MURTHY, C. K. N. Biological functions of epicatechin: plant cell to human cell health. **J. Funct. Foods.**, v2, p. 14–24, 2019.

PRATTI, D. L.; 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**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2015.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: jun de 2022.

PUBCHEM. **Miricitrina**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281673>. Acesso em: 3 jan. 2023.

PUBCHEM. **Pentagalactose**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65238> Acesso em 3 jan. 2023.

QADERI, M. M.; MARTEL, A. B.; STRUGNELL, C. A. Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. **Plants (Basel)**, v. 12, n. 3, p. 447, 2023.

RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACCHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, 2017.

RARO, O. H. F.; DA SILVA, R. M. C.; FILHO, E. M. R.; SUKIENNIK, T. C. T.; STADNIK, C.; DIAS, C. A. G.; OTEO IGLESIAS, J.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* from transplanted patients in Brazil: phylogeny, resistome, virulome and mobile genetic elements harboring blaKPC-2 or blaNDM-1. **Front. Microbiol.**, v. 11, p. 1563, 2020.

REMILA, S.; ATMANI-KILANI, D.; DELEMASURE, S.; CONNAT, J. L.; AZIB, L.; RICHARD, T.; ATMANI, D. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 274 – 286. 2015.

RIVAS, A. C. S.; LOPES, P. M.; DE AZEVEDO, M. M. B.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules**, v.17, p.6305–6316, 2012

RUAS, F.G. **Seleção de genótipos, manejo e perfil químico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.) no estado do Espírito Santo**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Centro de Ciências Humanas e Naturais. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, 2016.

SALEM, M. Z. M.; EL-HEFNY, M.; ALI, H.M.; ELANSARY, H. O.; NASSER, R. A.; EL-SETTAWYA, A. A. A.; EL SHANHOREY, N.; ASHMAWYG, N. A.; SALEM, A. Z. M. Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius*

ripened fruits against some pathogenic bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 120, p. 119-127, 2018.

SALEM, M. Z. M.; MOHAMED, A. A.; ALI, H. M.; AL FARRAJ, D. A. Characterization of Phytoconstituents from Alcoholic Extracts of Four Woody Species and Their Potential Uses for Management of Six *Fusarium oxysporum* Isolates Identified from Some Plant Hosts. **Plants (Basel)**, v. 29, n. 10(7), p. 1325, 2021. Doi:10.3390/plants10071325.

SETTANNI, L.; ALAZZOLO, E.; GUARRASI, V.; ALEO, A.; MAMMINA, C. Inibição de bactérias patogênicas de origem alimentar por óleos essenciais extraídos de frutas cítricas cultivadas na Sicília. **Food Control**, v.6, p. 326–330, 2012.

SILVA, J. H. S.; SIMAS, N. K.; ALVIANO, C. S. A.; ALVIANO, D. S.; VENTURA, J. A.; LIMA, E. J.; SEABRA, S. H.; KUSTER, R. M. Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural product research**, v. 32, n. 11, p. 1365-1368, 2018.

SILVA, M. V. **Atividade fungicida de novos triazóis sintetizados a partir do glicerol sobre *Fusarium guttiforme***. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Alegre, ES, 2014.

SONG, X.; TAN, L.; WANG, M.; REN, C.; GUO, C.; YANG, B.; REN, Y.; CAO, Z.; LI, Y.; PEI, J. Myricetin: A review of the most recent research. **Biomed. & Pharmac.**, v. 134, p. 111017, 2021.

SOUZA, D. C. L. **Diversidade genética, produção de frutos e composição química em *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, AL, 2012.

SRIVASTAVA, D.; YADAV, A.; NAQVI, S.; AWASTHI, H.; FATIMA, Z. Efficacy of flavonoids in combating fluconazole resistant oral candidiasis. **Curr Pharm Des.** v. 28, n. 21, p. 1703-1713, 2022.

STEPIEN, L.; KOCZYK, G.; WAŚKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. **J. Appl. Genetics**, v. 54, p. 367–380, 2013.

STESEVIC, D.; MIHAILO, R.; VUKO, N.; MARIJANA, N.; CAKOVIC, D.; ZLATKO, S. Chemotype Diversity of Indigenous Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) Populations in Montenegro. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 101-114, 2014.

SUAY-GARCÍA, B.; PÉREZ-GRACIA, M. T. Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infections. **Antibiotics**, v. 8, p. 122, 2019.

TODIRASCU-CIORNEA, E.; EL-NASHAR, H.A.S.; MOSTAFA, N.M.; ELDAHSHAN, O.A.; BOIANGIU, R.S.; DUMITRU, G.; HRITCU, L.; SINGAB, A.N.B. *Schinus terebinthifolius* Essential Oil Attenuates Scopolamine-Induced Memory Deficits via

Cholinergic Modulation and Antioxidant Properties in a Zebrafish Model. **Evid Based Complement Alternat Med**. Article ID 5256781, 2019.

TORRES-LEÓN, C.; VENTURA-SOBREVILLA, J.; SERNA-COCK, L.; ASCACIO-VALDÉS, J.A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.; AGUILAR, C.N. Pentagalloylglucose (PGG): A valuable phenolic compound with functional properties **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 176-189, 2017.

TURNER, N. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An overview of basic and clinical research. **Nat. Rev. Microbiol**, v.17, p. 203–218, 2019.

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

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, p. 277–83, 2015.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. Vitória: new pineapple cultivar resistant to fusariosis. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 51-55, 2009.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: Abacaxi, Banana e Mamão. In: ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais doenças e pragas**, Viçosa: UFV. 2. ed., cap. 9, p. 279-352, 2002.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. Controle de doenças de plantas fruteiras. **Viçosa**, v. 1, p. 445–510, 2002.

VERNIN, G.; PARKANYI, C. GC/MS analyses of the volatile constituents of *Schinus terebinthifolius* from Reunion Island. Abstract of papers in: 225th ACS National Meeting. Ed.: **American Chemical Society**, Washington D.C., USA, 2003.

VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. **Microbiol Spectr.**, v. 7, n.2, 2019.

VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JESUDHASAN, P. R.; PILLAI, S. D.; PATIL, B.S. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. **Journal of Applied Microbiology**., v.109, p. 515-527, 2010.

VU, T. T.; KIM, J. C.; CHOI, Y. H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; CHOI, T.; YOON, T. M.; LEE, S.W. Effect of gallotannins derived from *Sedum takesimense* on tomato bacterial wilt. **Plant Dis.**, v. 97, p. 1593–1598, 2013

WEI, J. N.; LIU, Z. H.; ZHAO, H. P.; ZHAO, L. L.; XUE, T. K.; LAN, Q. K. Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. **Food Chemistry**, v. 286, p. 260-267, 2019.

WHO - World Health Organization. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014.

WHO - World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Manual for Early Implementation. WHO. http://www.who.int/drugresistance/en/%5Cwww.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.%5Cn.http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/1/9789241549400eng.pdf?ua=1. 2015

WHO - World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistance Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2017.

YAKHIN, O. I.; LUBYANOW, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 2049, 2017.

YIGIT H., QUEENAN A. M., ANDERSON G. J., DOMENECH-SANCHEZ A., BIDDLE J. W., STEWARD C. D., Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 1151–1161, 2001

YU, J. S.; PARK, M.; PANG, C.; RASHAN, L.; JUNG, W. H.; KIM, K. H. Antifungal Phenols from *Woodfordia uniflora* Collected in Oman. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 7, p. 2261-2268, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00395

YOU, H. L.; HUANG, C.C.; CHEN, C. J.; CHANG, C. C.; LIAO, P. L.; HUANG, S. T.; Anti-pandemic influenza A (H1N1) virus potential of catechin and gallic acid. **J. Chin. Med.Assoc.**, v.81, p. 458–468, 2018.

ZHAO, Y.; WANG, B. E.; ZHANG, S. W.; YANG, S. M.; WANG, H.; REN, A. M.; YI, E. T. Isolation of antifungal compound from *Paeonia suffruticosa* and its antifungal mechanism. **Chin. J. Integr. Med.**, v.21, p. 211–216, 2015.