



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE

ADRIANA IDALINA TORCATO DE OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
PALMEIRAS (*ARECACEAE*) NATIVAS DO ESTADO DO
TOCANTINS E ESTUDOS QUÍMICOS DE COMPOSTOS
ATIVOS CONTRA PATÓGENOS HUMANO**

Palmas (TO),
novembro de 2017

ADRIANA IDALINA TORCATO DE OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
PALMEIRAS (*ARECACEAE*) NATIVAS DO ESTADO DO
TOCANTINS E ESTUDOS QUÍMICOS DE COMPOSTOS
ATIVOS CONTRA PATÓGENOS HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede
BIONORTE. Foi avaliada para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia e aprovada em sua forma final
pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Dra. Paula Benevides de Morais
Coorientador: Dr. Talal Suleiman Mahmoud

Palmas (TO),
novembro de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- T676b Torcato de Oliveira, Adriana Idalina .
BIOPROSPECÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PALMEIRAS
(ARECACEAE) NATIVAS DO ESTADO DO TOCANTINS E ESTUDOS
QUÍMICOS DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA PATÓGENOS HUMANO. /
Adriana Idalina Torcato de Oliveira. – Palmas, TO, 2017.
76 f.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
Biodiversidade e Biotecnologia, 2017.
- Orientadora : Paula Benevides Moraes
Coorientador: Talal Suleiman Marhמוד
1. Biotecnologia. 2. Palmeiras. 3. Estudos Químicos. 4. Atividades
Biológicas. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**BIOPROSPECÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
PALMEIRAS (ARECACEAE) NATIVAS DO ESTADO DO TOCANTINS E
ESTUDOS QUÍMICOS DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA PATÓGENOS
HUMANOS.**

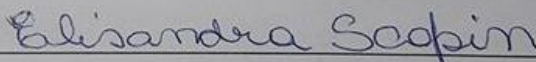
Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia - BIONORTE, Coordenação Estadual do Tocantins, como pré-requisito Parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Dra. PAULA BENEVIDES DE MORAIS

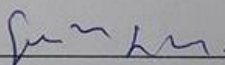
Banca examinadora



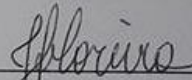
Prof. Dr. Talal Suleiman Mahmoud
Coorientador - Presidente da banca - Universidade Federal do Paraná



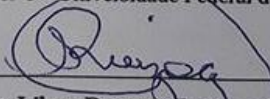
Profa. Dra. Elisandra Scapin
Examinador 2 - Universidade Federal do Tocantins



Prof. Dr. Guilherme Nobre L. do Nascimento
Examinador 3 - Universidade Federal do Tocantins



Profa. Dra. Juliana Fonseca Moreira da Silva
Examinador 4 - Universidade Federal do Tocantins



Profa. Dra. Lilyan Rosmery Luizaga de Monteiro
Examinador 5 - Universidade Federal do Tocantins

**PALMAS-TO
NOVEMBRO/2017**

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Tatiane e Angelo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sempre me iluminado e protegido em todos os momentos.

Aos meus pais: Wladimir Jesus Torcato que tenho como referência de honestidade, dedicação e trabalho e minha mãe: Rita Marinho Torcato (*in memorian*).

A toda minha família. Meus irmãos: Wladimir, Andrei e Bruno, a minha cunhada Jacinta, aos meus sobrinhos Andressa e Pedro, ao Marcelo Pires de Oliveira (*in memorian*) e em especial aos meus filhos Tatiane e Angelo que me suportaram e me deram força para seguir sempre em frente e concluir esse trabalho.

A minha orientadora Paula Benevides de Moraes por aceitar o desafio de me orientar.

Ao meu coorientador Talal Suleiman Mahmoud com quem compartilhei ideias e questionamentos.

Aos professores Raphael Sanzio Pimenta e Juliana Fonseca Moreira da Silva por acreditarem e investirem no meu trabalho, por sua amizade, seu exemplo de competência e ensinamentos que foram essenciais para a conclusão dessa tese.

A todos os amigos (professores, técnicos e alunos) da UFT e do Bionorte que possibilitaram a realização desse Doutorado que não vou citar nomes para não correr o risco de esquecer de alguém, mas que compartilharam comigo risos, tristezas, conselhos, dificuldades e incentivos durante todo esse tempo.

Aos amigos do LMGA (Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada) pelo companheirismo e respeito mútuo.

Aos professores, técnicos e amigos do Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB) pelo uso dos equipamentos e instalações e em especial a professora Dra. Maria Lucília dos Santos e ao químico Alan Ribeiro Mol.

Ao departamento de Química do Centro de Ciências Tecnológicas (CCT) da Universidade Estadual de Santa Catarina (UNIDESC) pelas análises feita no aparelho de GC/MS.

Aos professores da banca pelas contribuições que irão acrescentar muito a qualidade dessa tese.

Muito obrigado!!!

EPIGRAFE**Canção do Exílio**

*Minha terra tem palmeiras,
Onde canta o Sabiá;
As aves, que aqui gorjeiam,
Não gorjeiam como lá.
Nosso céu tem mais estrelas,
Nossas várzeas têm mais flores,
Nossos bosques têm mais vida,
Nossa vida mais amores.
Em cismar, sozinho, à noite,
Mais prazer eu encontro lá;
Minha terra tem palmeiras,
Onde canta o Sabiá.
Minha terra tem primores,
Que tais não encontro eu cá;
Em cismar sozinho, à noite
Mais prazer eu encontro lá;
Minha terra tem palmeiras,
Onde canta o Sabiá.
Não permita Deus que eu morra,
Sem que eu volte para lá;
Sem que disfrute os primores
Que não encontro por cá;
Sem que ainda aviste as palmeiras,
Onde canta o Sabiá.*

Gonçalves Dias (1847)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	17
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.2 JUSTIFICATIVA.....	20
1.3 OBJETIVO GERAL	21
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
1.5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.5.1 O BABAÇU (<i>Attalea speciosa</i> Mart.).....	22
1.5.2 O BURITI (<i>Mauritia flexuosa</i> L.f.).....	23
1.5.3 A MACAÚBA (<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.).....	24
1.5.4 MICROORGANISMO PATOGÊNICO	25
1.6 REFERÊNCIAS	30
2. ARTIGO I – CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF PALM LEAF EXTRACTS FROM BABAÇU (<i>ATTALEA SPECIOSA</i>), BURITI (<i>MAURITIA FLEXUOSA</i>), AND MACAÚBA (<i>ACROCOMIA ACULEATA</i>)....	36
ABSTRACT.....	36
2.1. INTRODUCTION.....	38
2.2. MATERIALS AND METHODS	39
2.2.1 Sample Preparation and Extraction Using Solvent.	39
2.2.2 Phytochemical Screening	40
2.2.3 Antimicrobial activity	40
2.2.4 GC/MS	41
2.3 RESULTS AND DISCUSSION	41
2.4. CONCLUSION	44
2.5 REFERENCES.....	45
3. ARTIGO II – IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND FATTY ACID COMPOSITION THROUGH GC-MS OF ETHANOL EXTRACTS OF <i>MAURITIA FLEXUOSA</i> (BURITI) FRUITS	48
ABSTRACT.....	48
3.1 INTRODUCTION.....	50
3.2 MATERIALS AND METHODS	51
3.2.1 Chemicals.....	51

3.2.2 Plant materials	51
3.2.3 Sample preparation.....	51
3.2.4 GC – MS	52
3.2.5 Antimicrobial Assays	53
3.3 RESULTS	55
3.3.1 Extract yields.....	55
3.3.2 Fatty Acid Determination by Gas Chromatography.....	55
3.3.3 Antimicrobial Activity of Crude Extracts	56
3.4 DISCUSSION	57
3.5 CONCLUSION	61
3.6 REFERENCES.....	62
4. ARTIGO III – EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS E INFLORESCÊNCIAS DA PALMEIRA MACAÚBA ACROCOMIA ACULEATA (JACQ) LODD EX MART	67
RESUMO	67
ABSTRACT.....	68
4.1 INTRODUÇÃO	69
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	70
4.2.1 Reagentes Utilizados.....	70
4.2.2 Preparação das Amostras.....	70
4.2.3 GC –MS.	72
4.2.4 Atividade Antibacteriana.....	73
4.3. RESULTADOS.....	74
4.3.1 GC – MS.	74
4.3.2 Atividade Antibacteriana.....	76
4.4 DISCUSSÃO.....	77
4.5 CONCLUSÃO	79
4.6 REFERÊNCIAS	81
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
6. ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

Contextualização	pg.
Figura 1. Parede celular de bactéria: 1) Gram positiva, 2) Gram negativa.....	26
 Artigo I	pg.
Figure 1. Photos from personal files. (a) <i>Acrocomia aculeata</i> . (b) <i>Attalea speciosa</i> . (c) <i>Mauritia flexuosa</i>	37
Figure 2. Humidity and yield extraction for <i>A. speciosa</i> , <i>M. flexuosa</i> and for <i>A. aculeata</i>	41
 Artigo II	pg.
Figure 1. <i>Mauritia flexuosa</i> is a palm tree it grows in and near swamps and other wet areas (a), ripe fruit (b), Fruit immersed in water (c), peeled fruit (d), and (e) shells separated for drying. Photos by the author	51
 Artigo III	pg.
Figura 1. Palmeira adulta de <i>A. aculeata</i> em seu habitat (a), espata com inflorescência (b) e frutos maduros coletados (c). Fotos de arquivo pessoal.....	69
Figura 2. Preparação dos frutos. (a) Separação da amêndoa, polpa e casca, (b) secagem de amêndoas e polpa em estufa a 40 - 45 °C. Fotos de arquivo pessoal.	70
Figura 3. Preparação de amostras. Flores unissexuais de ambos os sexos retiradas da inflorescência (a), extração com solvente etanol e aparelho Soxhlet (b). Fotos de arquivo pessoal.	71
Figura 4. Teste de difusão em poço. (a) Comparação com escala Mc Farland, (b) perfuração dos poços e (c) adição de solução de extrato. Fotos de arquivo pessoal.	72
 Anexos.....	pg.
Cromatogramas GC/MS dos extratos das amostras obtidos após derivatização com BF ₃ /CH ₃ OH em coluna HP-5ms, Arquivo Pessoal.....	84

LISTA DE TABELAS

Artigo I	pg.
Table 1. The major chemical compounds detected (Area, %) and retention time (RT) in the leaf extracts of <i>A. speciosa</i> , <i>M. flexuosa</i> and <i>A. aculeata</i> by GC/MS analysis.....	42
Artigo II	pg.
Table 1. Fatty acid composition (%) of the ethanol extract from <i>Mauritia flexuosa</i> peel (EPBU) and pulp (ECBU).....	54
Table 2. Mean diameter of growth inhibition (in millimeters (mm)) of bacterial strains in susceptibility tests using the ethanolic extracts ECBU and EPBU (concentration: 50, 100 and 200 mg mL ⁻¹) from <i>M. flexuosa</i> fruits.....	55
Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in mg/mL of crude ethanolic extracts from the peel (ECBU) and the pulp (EPBU) of <i>M. flexuosa</i> with antimicrobial activities.....	56
Artigo III	pg.
Tabela 1: Ácidos graxos detectados (Área, %) e tempo de retenção (RT) dos extratos etanólicos da amêndoa, polpa e flores de <i>A. aculeata</i> por análise GC-MS.	74
Tabela 2. Média das triplicatas do diâmetro do halo de inibição em milímetros (mm) da susceptibilidade antimicrobiana dos extratos etanólicos EAM, EPM e EFM na concentração de 100 mg mL ⁻¹	75
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg mL ⁻¹ de extratos etanólicos da amêndoa (EAM), da polpa (EPM) e das flores (EFM) de <i>A. aculeata</i> com atividades antibacterianas.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGI: ácidos graxos insaturados
- AGS: ácidos graxos saturados
- ATCC: American Type Collection Culture
- CFU: Unidades Formadoras de Colônia (Colony Forming Unit)
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- DTA: doenças transmitidas por alimentos
- EAM: Extrato Etanólico de Amêndoa de Macaúba
- ECBU: Extrato Etanólico de Casca de Buriti
- EFIMa: Extrato Etanólico de Flor de Macaúba
- EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
- EPBU: Extrato Etanólico de Polpa de Buriti
- EPM: Extrato Etanólico de Polpa de Macaúba
- G-: bactéria Gram negativa
- G+: bactéria Gram positiva
- GC - MS: Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometer
- MIC: Concentração Inibitória Mínima (Minimum Inhibitory Concentration)
- MMA: Ministério do Meio Ambiente
- NIST: National Institute of Standards and Technology
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- WHO: World Health Organization

RESUMO

O Brasil é considerado o país detentor da maior biodiversidade conciliando com a preservação da cultura das comunidades locais, esta tese trata da avaliação do potencial antimicrobiano e caracterização química dos compostos presentes nos extratos obtidos das palmeiras: Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*) e Macaúba (*Acrocomia aculeata*). O início do trabalho começa com uma contextualização onde são colocados introdução geral, os principais objetivos e justificativa do trabalho bem como uma revisão bibliográfica. No artigo 1 foram realizados estudos das folhas das palmeiras e os extratos etanólicos obtidos não apresentaram atividade antimicrobiana significativa segundo o teste de disco-difusão para os micro-organismos testados. A abordagem fitoquímica desses extratos indicou a presença de grupos de substâncias importantes como: taninos, flavonóides, catequinas, esteróides, triterpenóides e saponinas. A cromatografia gasosa (GC-MS) confirmou a presença de terpenos e identificou a presença de ácidos graxos de importância econômica. No artigo 2 nos extratos etanólicos obtidos a partir da polpa e da casca dos frutos de Buriti (*M. flexuosa*) foram identificados através da cromatografia gasosa a presença de ácidos graxos saturados e insaturados. Esse fato justificou as atividades antimicrobianas realizadas por método de difusão em poço e microdiluição apresentando inibição frente as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* que são patógenos humanos. Os resultados desse trabalho demonstraram que o extrato obtido da casca apresentou melhor inibição aos micro-organismos testados em concentrações menores do que o da polpa apresentando-se como candidato potencial na prospecção de novos fármacos. No artigo 3 fez-se o estudo dos extratos etanólicos obtidos a partir do fruto (amêndoa e polpa) e das inflorescências da palmeira Macaúba (*A. aculeata*). Os testes fitoquímicos indicaram a presença de ácidos orgânicos apenas nos extratos da polpa e da inflorescência sendo confirmado pelas análises de GC-MS. O extrato etanólico obtido a partir das flores foi o único que apresentou atividade antibacteriana pelo

método de difusão em poço frente as cepas: *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus* e no método de microdiluição apresentou inibição para: *E. coli* e *S. aureus* demonstrando ter potencial para uso como agente antibacteriano. Alguns resultados obtidos neste trabalho são inéditos visto que ainda não foram relatados na literatura.

Palavras-Chave: buriti, babaçu, macaúba, caracterização química, GC-MS.

ABSTRACT

Brazil is considered the country that own the highest biodiversity. This thesis deals with the evaluation of antimicrobial potential and chemical characterization of the compounds that are present in the extracts obtained from the following palm trees: Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*) and Macaúba (*Acrocomia aculeata*), based on the conservation of biodiversity with the preservation of local communities cultural assets. In the contextualization, it is presented a general introduction, the main objectives and reasoning of the work as well as a brief description of the literature review. In the article 1, studies on the palm leaf showed that the ethanolic extracts obtained did not present significant antimicrobial activity against the tested microorganisms by the disc diffusion test. The phytochemical analysis of those extracts indicated the presence of important groups such as: tannins, flavonoids, catechins, steroids, triterpenoids and saponins. Gas chromatography (GC-MS) confirmed the presence of terpenes and fatty acids of economic importance and the compounds were identified, among them: linoleic (omega-6) and linolenic (omega-3) acids. In the article 2, the ethanolic extracts obtained from the pulp and the bark of the Buriti (*M. flexuosa*) fruits were identified through gas chromatography and the presence of saturated and unsaturated fatty acids was determined. This fact justified the antimicrobial activities performed by the well diffusion and microdilution methods, which were performed against bacteria that are human pathogens *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The results of this study demonstrated that the bark extract showed better inhibition response for the tested microorganisms, but in lower concentrations than the pulp extract. This makes the extract a potential candidate for the prospection of new drugs. In the article 3, the study was made with the ethanolic extracts obtained from the fruit (almond and pulp) and the inflorescences of the Macaúba (*A. aculeata*) palm tree. The phytochemical tests have indicated the presence of organic acids only in the pulp and in the inflorescence, these extracts were confirmed by GC-MS analyzis. The ethanolic extract obtained from the

inflorescence was the only one that presented antibacterial activity by the well diffusion method against the bacteria: *E. faecalis*, *E. coli* and *S. aureus* and by the method of microdilution against the bacteria: *E. coli* and *S. aureus*, which demonstrates the potential of the extract as an antimicrobial agent. The results presented herein are a novelty, since those plant substrates were not yet studied in depth.

Keywords: buriti, babaçu, macaúba, chemical characterization, GC-MS.

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

As palmeiras compõem uma das maiores e mais importantes famílias vegetais nos ecossistemas tropicais, tanto em número de espécies como em abundância (aproximadamente 200 gêneros, mais de 2000 espécies). A Amazônia brasileira é a maior região de florestas tropicais do planeta e abriga a maior diversidade de palmeiras do território brasileiro. Nessa região são encontrados 35 dos 42 gêneros e cerca de 150 das 193-208 espécies conhecidas no Brasil segundo Henderson et al. (1995). Seu porte elegante, determinado por suas características, as distingue prontamente das outras plantas, razão pela qual Linnaeus (1753) as denominou “Príncipes” do reino vegetal. O mais recente sistema de classificação de palmeiras é baseado no trabalho de Moore (1973). Palmeira é o nome comum das plantas da família *Arecaceae*, anteriormente conhecida como *Palmae* ou *Palmacea*. A maioria das palmeiras que são utilizadas pelos habitantes dos estados que compõem a Amazônia legal, de acordo com Campos e Ehringhaus (2003) possuem frutos comestíveis, raízes, folhas e outras partes passíveis de algum tipo de aproveitamento. As palmeiras também são muito encontradas no Cerrado por serem eficientes na colonização e sobrevivência em novos *habitats*, especialmente naqueles alterados pelo homem. Na busca por substâncias bioativas, o estudo das palmeiras nativas do Brasil é uma alternativa eficiente devido à sua alta capacidade de produção de metabólitos secundários com estruturas químicas diversas. Dentre estas, as mais procuradas são as substâncias com atividades farmacológicas, tanto pela comunidade científica mundial como pelas indústrias farmacêuticas.

O estado do Tocantins é uma região antropizada que possui os domínios Cerrado e Amazônico em processo de degradação pela ocupação humana desordenada e intensificada pela

criação do Estado, em 1988. Dentre as espécies nativas que têm sido exploradas em seu ambiente natural, três espécies se destacam no estado do Tocantins: Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*) e Macaúba (*Acrocomia aculeata*).

Nesta primeira parte do trabalho é realizada uma contextualização onde são apresentados os tópicos: introdução, objetivos geral e específico, justificativa e revisão bibliográfica sobre as espécies vegetais e os micro-organismos utilizados no estudo para o desenvolvimento e melhor análise sobre o respectivo assunto. Em seguida são colocados os artigos desenvolvidos em ordem de execução do estudo. O artigo 1 traz os resultados obtidos da análise da composição química e atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos obtidos a partir das folhas das palmeiras (Babaçu, Buriti e Macaúba). Neste artigo foram identificados nos extratos a presença dos grupos: taninos, flavonóides, catequinas, esteróides, triterpenóides e saponinas através da fitoquímica. A análise por cromatografia gasosa confirmou a presença de terpenos e identificou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados. Os testes de difusão por disco realizada frente a cepas de bactérias Gram positivas (*E. faecalis* e *S. aureus*), Gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e leveduras (*C. albicans* e *C. parapsilosis*), utilizando diluições dos extratos, não demonstraram inibição.

No segundo artigo foi realizado o estudo dos compostos químicos presentes nos extratos da polpa (endocarpo) e na casca dos frutos do buriti (*M. flexuosa*). A análise das substâncias presentes nos extratos etanólicos por GC-MS identificou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados que justificaram a inibição encontrada frente às bactérias: *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* nos testes realizados por difusão em poço e microdiluição com soluções diluídas dos extratos. Segundo os resultados obtidos o extrato etanólico obtido das cascas de buriti apresentou melhor inibição que o extrato da polpa apresentando potencial para a confecção de novos produtos.

No artigo 3 foi realizada a caracterização química por fitoquímica e GC-MS e testes antibacterianos dos extratos etanólicos dos frutos e das flores da palmeira macaúba. O extrato

das sementes (amêndoas) não apresentou grupos químicos importantes através da triagem fitoquímica, no entanto tanto o extrato da polpa como das flores indicou a presença de saponinas e ácidos orgânicos. As análises por cromatografia dos extratos identificaram a presença de ácidos graxos saturados e insaturados em todos os extratos. Nos testes de atividade antibacteriana usando o método de difusão em poço e microdiluição para obtenção da concentração inibitória mínima somente o extrato das flores apresentou inibição frente as bactérias testadas demonstrando seu potencial para utilização em novos produtos com função antibacteriana.

O desenvolvimento biotecnológico de novos produtos a partir de espécies oriundas do Tocantins implica no fortalecimento de políticas de defesa o que contribui para a conservação da biodiversidade existente, uso sustentável e aproveitamento destas espécies vegetais não somente pela população das regiões onde são encontradas, mas por toda a população.

1.2 JUSTIFICATIVA

Uma das famílias botânicas mais importantes da região amazônica são as palmeiras, em razão de sua ampla distribuição e abundância nos diversos ecossistemas e, principalmente por sua importância como fonte de alimentos, remédios, materiais de construção e outras utilidades para comunidades locais. Diversos compostos químicos podem ser encontrados em palmeiras das espécies da família Araceae. O estudo de novos produtos obtidos a partir de plantas é recomendado por diversos autores, devido ao metabolismo secundário dos vegetais serem fontes de substâncias químicas com estruturas não convencionais, além do aproveitamento da grande biodiversidade brasileira (OMS, 2002). O desenvolvimento biotecnológico de novos produtos a partir de espécies oriundas dessa região implica no fortalecimento de políticas ambientais, o que contribui para a conservação da biodiversidade existente.

1.3 OBJETIVO GERAL

Identificação das substâncias químicas biologicamente ativas presentes nos extratos das folhas, frutos e inflorescências das palmeiras: *Attalea speciosa*, *Mauritia flexuosa* e *Acrocomia aculeata* no estado do Tocantins.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Coletar as amostras e confeccionar exsiccatas para identificação botânica das palmeiras.
- b) Obter dos extratos das diversas partes das palmeiras.
- c) Identificar dos grupos de compostos químicos presentes nos extratos através de triagem fitoquímica.
- d) Identificar das substâncias químicas presentes nos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.
- e) Avaliar das atividades antimicrobianas dos extratos utilizando testes de difusão e microdiluição frente a cepas de referência.
- f) Correlacionar os resultados obtidos nas análises químicas e microbiológicas para confecção de artigos científicos.

1.5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.5.1 O BABAÇU (*Attalea speciosa* Mart.)

O nome babaçu tem origem do Tupi-Guarani: (ba: fruto; açu: grande) (Henderson, 1995). A taxonomia do babaçu é confusa em virtude da coleta de espécimes muitas vezes incompletos e pelo aparecimento de híbridos resultantes do cruzamento com outras espécies (Anderson e Balick, 1988). O Babaçu (*Attalea speciosa*) é uma arecácea brasileira com grande distribuição geográfica ocupando grande parte território nacional. Nos estados do Maranhão e Tocantins cerca de 10,3 milhões de hectares são ocupadas por florestas de babaçu (Ferreira, 2005; Teixeira, 2002). De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2009) o babaçu é descrito como uma palmeira monocaule de porte grande com tronco cilíndrico e copa em formato de taça, que pode atingir até 20 m de altura, com frutificação entre 8 e 10 anos, e que atinge atividade plena aos 15 anos, com tempo de vida média em torno dos 35 anos.

Cada palmeira possui até seis cachos pendulares, contendo entre 150 e 300 cocos. Os frutos pesam entre 90 e 280 g cada um, com formato oval alongado de coloração marrom, variando de três a oito amêndoas no interior de cada coco (Teixeira e Carvalho, 2007). Segundo Pavlak et al. (2007), aproveita-se industrialmente todas as partes físicas do fruto (epicarpo, mesocarpo, endocarpo e as amêndoas). O aproveitamento dessas partes vai desde artesanatos à alimentação animal, podendo gerar em torno de 64 produtos (Carrazza, 2012). Carvalho (2007) relata que as folhas retilíneas e longas servem como matéria prima para fabricação de artesanato como: cestos, abanos, peneiras, esteiras, cercas, janelas, armação e cobertura de casas e abrigos, entre outros. Os frutos dessa palmeira possuem potencial econômico para aproveitamento tecnológico e industrial, com produção média de 2400 kg ha⁻¹, onde 1780 kg (74 %) são endocarpo; 480 kg (20 %) mesocarpo e 140 kg (6 %) correspondem às amêndoas que podem produzir até 91 litros de óleo (Frazão, 2001). Os talos dessas folhas são utilizados na construção

de cercados e na estruturação das paredes das casas de barro (Pinto et al., 2010). Quando jovem, da palmeira se extrai o palmito e coleta-se uma seiva que, ao ser fermentada, produz um vinho de sabor bastante apreciado regionalmente. O estipe do babaçu pode ser usado na fabricação de marcenaria rústica e quando apodrece, serve de adubo (Albiero et al., 2007). Portanto a palmeira babaçu apresenta grande importância do ponto de vista ecológico, social e político visto que se trata de um recurso extrativista que envolve o trabalho de milhares de famílias nas regiões onde é nativo contribuindo para manutenção das populações locais e para conter o êxodo rural (Oliveira et al., 2013).

1.5.2 O BURITI (*Mauritia flexuosa* L.f.)

Mauritia flexuosa foi originalmente descrita por Linnaeus f. em 1872. É uma espécie muito comum em ambientes inundados sazonalmente e com ampla distribuição por toda a região amazônica (Henderson, 1995). A etimologia do gênero é uma homenagem ao holandês Mauritius de Nassau. No Brasil *M. flexuosa* ocorre no Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Goiás e São Paulo sendo conhecida como buriti, mas existe uma extensa lista de nomes mais comuns como: muriti, carandaí-guaçu, buri, buriti-do-brejo, buritizeiro, moriti, pissondó, palma de vinho, palmeira-dos-brejos. Esta palmeira cresce em faixas de matas úmidas ao longo dos rios, também se encontra dispersa ou em populações, em pântanos, em terrenos ácidos (pH~3.5) e ricos em matéria orgânica. (Pinheiro, 2011). O buriti é uma palmeira monocaule, dióica, com até 30 m de altura, caule liso medindo no máximo 50 cm de diâmetro, folhas com até 6,0 m de comprimento do tipo costapalmadas, frutos elipsóides cobertos por uma casca formada por pequenas escamas marrom-avermelhadas, que protegem o fruto do ataque de animais e evita a entrada de água. O mecanismo de dispersão dessa palmeira se faz principalmente por meio da água, ocasionando, nos ecossistemas onde são encontrados, extensas populações de buritizais (Miranda e Rabelo, 2008).

Essas espécies vegetais são consideradas espécies-chave localmente por conta de seu valor ecológico, possuem altas densidades e são abrigos naturais para uma grande diversidade da fauna (Resende et al., 2012). Devido a sua diversidade de usos o buriti tornou-se conhecido como “Árvore da Vida” visto que, praticamente todas as suas partes podem ser aproveitadas, além de ajudar na manutenção de nascentes e cursos de água, sendo assim fundamental para o ecossistema e para as populações que nele vivem. Muitos animais fazem uso dessa palmeira como: a anta, a queixada, o veado, o cateto, o jabuti, o lobo-guará, os macacos e muitas curicas, araras e papagaios. Os frutos do buriti são ricos em vitaminas A, B, C, E, fibras, além de carotenóides, tocoferóis, ferro e lipídeos (Ramos et al., 2008) o que é bastante promissor para a indústria de cosméticos e alimentos.

1.5.3 A MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.)

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart (Mirisola Filho, 2009) é uma espécie nativa que pode ser encontrada em savanas e florestas abertas da América tropical. No Brasil, além de macaúba, também é conhecida como: macaúva, mucaja, mucuja, macaíba, macajuba, coco baboso, coco de catarro, chiclete de baiano, bocaiúva, entre outros, dependendo da região. A *Acrocomia aculeata* é uma espécie de ampla distribuição geográfica no território brasileiro, ocorrendo desde os estados do Sul, passando por São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, toda região Centro-Oeste, pelo Nordeste e Norte do Brasil (Aquino et al., 2008). O caule da macaúba pode atingir de 10 a 15 metros de altura e de 30 a 45 cm de diâmetro. Possui copa rala e aberta com as folhas inferiores arqueadas. As folhas dessa espécie de palmeira são compostas, pinadas e de coloração verde-escura, variando de 4 a 5 metros de comprimento (Lorenzi, 2006). A *Acrocomia aculeata* apresenta inflorescências interfolias de coloração amarelada, agrupadas em cachos pendentes com comprimento de 50 a 80 cm e a polinização é realizada através de besouros (Sodré, 2005). Os frutos dessa palmeira são esféricos, lisos e apresentam coloração

marrom-amarelada quando maduros. A amêndoa é oleaginosa, comestível e fortemente aderida à polpa. A polpa também é comestível e apresenta coloração amarela, rica em óleo, fibra e mucilagem (Costa, 2009). De acordo com Lorenzi (2002), a macaúba apresenta uma madeira moderadamente pesada, dura e de longa durabilidade que pode ser empregada em construções rurais, na confecção de ripas, calhas para água, produção de mourões e estacas, entre outros. Além disso, pode-se obter do miolo do tronco uma fécula nutritiva. Ainda, segundo o mesmo autor, as folhas dessa palmeira fornecem fibras têxteis para fabricação de redes e linhas de pescar, além de possuírem caráter forrageiro. Outro uso comum é o emprego da palmeira no paisagismo. A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem, principalmente, entre setembro e janeiro (Scariot, 1998). A *A. aculeata* tem no óleo extraído dos seus frutos, polpa e amêndoa sua mais extensa utilização. Este pode ser utilizado na produção de biodiesel, alimentos, cosméticos e fármacos. As folhas podem ser utilizadas misturadas à outros vegetais na alimentação do gado. A amêndoa também pode ser transformada em torta para alimentação do gado e as fibras em carvão de excelente qualidade de acordo com Caño Andrade et al. (2006). É crescente o aumento do interesse econômico sobre esta espécie devido ao valor econômico e rentabilidade do óleo proveniente dos frutos tanto para produção de energia (biodiesel) quanto para fins alimentícios.

1.5.4 MICRORGANISMO PATOGÊNICO

Os micro-organismos são organismos microscópicos que incluem os vírus: 1 nm, bactérias: 1 µm, fungos: 100 µm de diâmetro, que habitam uma ampla diversidade de habitats naturais e antrópicos, e estabelecem relações ecológicas com animais e plantas. Com estes organismos, são estabelecidas relações em diferentes graus de parasitismo, mutualismo e comensalismo. Entre tais relações, a patogenia é reconhecidamente de impacto à saúde, pois vários grupos de

vírus, bactérias e também fungos e protozoários são causadores de doenças em humanos, entre outros animais, e responsáveis pela deterioração de equipamentos e alimentos.

i) Candidas

As leveduras do gênero *Candida* se multiplicam assexuadamente por gemulação, mas não têm seu ciclo sexual conhecido. Atualmente existem cerca de duzentas espécies de leveduras incluídas no gênero *Candida*, considerado um gênero polifilético de ascomicetos e cuja revisão taxonômica tem sido recomendada pelos especialistas. Pouco mais de 20 espécies são responsáveis por causar infecções aos seres humanos. Algumas candidas fazem parte da microbiota humana e animal colonizando a pele e mucosas dos tratos digestivo, urinário, bucal e vaginal. Estas leveduras são consideradas o principal grupo de fungos patógenos oportunistas, representando cerca de 8-10% das causas de infecções sanguíneas nosocomiais (infecções adquiridas em meio hospitalar) em Unidades de Tratamento Intensivo - UTIs (Hossain et al., 2003, Borg-von et al., 2007, Kumar et al., 2008, Karkowska-Kuleta et al., 2009, Negri et al., 2010). Dentre as espécies do gênero, *Candida albicans* tem sido relatada como a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Lu et al., 2004, Odds et al., 2006, Pfaller & Diekema 2007, Panizo et al., 2009). Atualmente diversas pesquisas estão sendo realizadas na utilização de extratos, óleos essenciais e substâncias de plantas que conseguem inibir *C. albicans*. Nos países como a Índia, África e outros da América Latina, a maioria dos trabalhos iniciam a partir de um levantamento etnofarmacológico, que identifica as espécies vegetais mais usadas pela população (Duarte et al., 2005)

ii) Bactérias

As bactérias, por serem procariotos, apresentam uma organização celular simplificada, sem organelas. A maioria das bactérias apresenta parede celular que é variável em sua composição química o que determina a existência de grupos de bactérias, denominadas de

Gram positivas e Gram negativas pela técnica de coloração de Gram (Figura 1). As bactérias Gram positivas apresentam uma parede com várias camadas, conferindo maior rigidez a parede. A maioria dos cocos de importância clínica (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*) é Gram positiva. A estrutura da parede células das bactérias Gram negativas é mais complexa. Apresenta uma camada mais estreita de peptidoglicano e a membrana externa. A maioria dos bacilos de importância clínica (*Escherichia*, *Samonella*, *Vibrio*, *Shigella*, *Pseudomonas* etc) é Gram negativa.

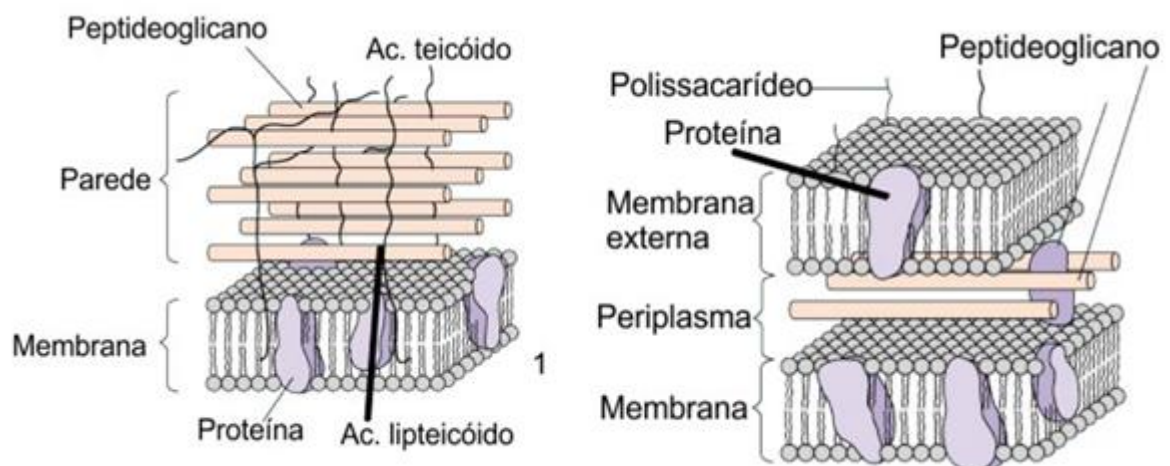


Figura 1. Parede celular de bactéria: 1) Gram positiva, 2) Gram negativa. Fonte: MMIMS et al. (1995), modificado.

Bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

O *Staphylococcus aureus* é do grupo dos cocos Gram positivos e catalase positivos, é uma bactéria esférica, imóvel, não-esporulada e geralmente não-encapsulada. O diâmetro dessas bactérias oscila entre 0.5 e 1.5 micras. Caracterizam-se porque dividem-se em grupos que assemelham com cachos de uva (Harris et al., 2002). A intoxicação alimentar por estafilococos é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas em alimentos (Feitosa et al., 2017). O *Staphylococcus* pode provocar doenças que se diferenciam em infecções simples como

espinhas, furúnculos e celulites, e infecções graves que são meningites, pneumonia, endocardite, síndrome do choque tóxico entre outras (Santos, 2009). O *Staphylococcus aureus*, possui como principal reservatório o homem, no qual este micro-organismo é o agente mais comum de infecções piogênicas localizadas na pele ou em regiões mais profundas como furúnculos, foliculites, osteomielites, endocardites, pneumonias, septicemias fatais e outros tipos de manifestações. Pode-se encontrar este micro-organismo colonizado várias partes do corpo como fossas nasais, garganta, intestinos e pele, sendo que cavidade nasal tem sido apontada como a área mais frequentemente colonizada e a mais importante fonte do mesmo. As mãos tem sido uns dos principais meios de transmissão dessa bactéria (Santos, 2004).

Os *Enterococcus* são cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem aos pares e em curtas cadeias, e são catalase negativos (Teixeira e Facklam, 2003). Nos Estados Unidos, os *Enterococcus* tornaram-se o segundo micro-organismo mais comumente isolado do trato urinário e das feridas e a terceira causa mais comum de bacteremia hospitalar (Murray et al., 2004). O principal reservatório humano dos *Enterococcus* é o trato gastrointestinal, porém ele pode ser encontrado, com menos frequência, em cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina (Koneman et al., 2001). Também podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, especialmente pássaros e insetos (Teixeira e Facklam, 2003). A maior parte das infecções por *Enterococcus* origina-se da microbiota normal do paciente, embora os micro-organismos possam também ser transferidos de paciente para paciente ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (Murray et al., 2004). Tornaram-se, porém, importantes agentes de doenças humanas devido principalmente à sua resistência a agentes antimicrobianos (Koneman et al., 2001).

Bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Escherichia coli (*E. coli*) é um micro-organismo pertencente à família Enterobacteriaceae, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente, 10% é capaz de causar doenças intestinais e extra intestinais

(Santos et al., 2009). É considerada a espécie de bactéria mais versátil entre as enterobactérias, e mais frequentemente isoladas em cultura de fezes e urina, além de ser o agente mais frequente isolado nas infecções diarreicas e infecção do trato urinário (Goettsch et al., 2000). Existem muitas estirpes de *E. coli*, desde formas comensais até formas patogênicas. O intestino da maioria dos animais de “sangue quente”, inclusive o homem, é colonizado por formas comensais de *E. coli*. O contágio por *E. coli* se dá através da ingestão de água ou alimentos que não foram processados e tiveram algum tipo de contaminação fecal durante a sua produção, como por exemplo, leite não-pasteurizado (Alves, 2012).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa que pode ser isolada em diversos ambientes, como plantas, animais e, principalmente, no solo e na água, sendo causadora de infecções oportunistas principalmente em indivíduos imunocomprometidos, portadores de AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), câncer ou fibrose cística, por exemplo. O espectro de doenças causadas por este agente, compreende desde infecções superficiais da pele a sepse fulminante (Murray, 1995). A *P. aeruginosa* pode causar infecção aguda pela produção de toxinas e infecção crônica pela ação da camada espessa que consiste no seu biofilme, e ainda, pode resultar no somatório dos tipos de infecção pela ação concomitante desses componentes (Palleroni, 1998). O tratamento é de difícil controle devido ao seu padrão de resistência aos antimicrobianos.

A resistência microbiana aos antimicrobianos já existentes vem se tornando uma preocupação mundial. Devido a isso uma das alternativas que está surgindo é o aumento do estudo de antimicrobianos de origem vegetal (Silva et al., 2010)

1.6 REFERÊNCIAS

- Albiero D, Maciel SJ, Lopes CA, Mello AC, Gamero AC (2007). Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata* Martiana) para a agricultura familiar. Revista Acta Amazônica. 37(3): 337-346.
- Alves A R F (2012). Doenças alimentares de origem bacteriana. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto. 87f.
- Anderson AB, Balick MJ (1998). Taxonomy of babassu complex (*Orbignya* spp.) (Palmae). System. Bot. 13: 32-50.
- Aquino FG et al. (2008). Distribuição geográfica das espécies *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood ex. Mart. e *Caryocar brasiliense* Cambess. no bioma Cerrado. In: Simpósio Nacional Cerrado: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais, Brasília, DF.
- Borg-von ZM, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M (2007). Gross U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. J. Antimicrob Chemother. 60: 424-428.
- Campos MT, Ehringhaus C (2003). Plant virtues are in the eyes of the beholders: a comparison of known palm uses among indigenous and folk communities of southwestern Amazonia. Economic Botany. Economic Botany. 57(3): 324-344.
- Caño Andrade MH, Andrade MHC, Vieira AS, Aguiar HF, Chaves JFN, Neves RMPS, Miranda TLS, Salum A (2006). Óleo do Fruto da Palmeira Macaúba Parte I: Uma Aplicação Potencial Para Indústrias de Alimentos, Fármacos e Cósmeticos. Anais do II ENBTEQ - Encontro Brasileiro sobre Tecnologia na Indústria Química. São Paulo - SP.

- Carvalho JDV (2007). Cultivo de babaçu e extração do óleo. Dossiê técnico: Centro de Apoio ao desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB. 22p.
- Costa CF (2009). Solos e outros fatores ambientais associados à diversidade fenotípica de macaúba no estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Gestão dos Recursos Agroambientais) - Instituto Agrônomo, Campinas, SP. 54p.
- Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C (2005). Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. *J. of Ethnopharmacol.* 97: 305-311.
- Feitosa AC, Rodrigues RM, Torres EA, Silva JFM (2017). *Staphylococcus aureus* em Alimentos. *Revista Desafios*. Artigo aceito para publicação.
- Ferreira AJA (2005). O babaçu enquanto alternativa energética do Maranhão: possibilidades. *Ciências Humanas em Revista*. 3(2): 187 – 202,
- Frazão JMF (2001). Alternativas econômicas para agricultura familiar assentadas em áreas de ecossistemas de babaçuais. Relatório técnico. Governo do Estado do Maranhão, São Luis. 120p.
- Goettsch W. et al. (2000). Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 46(2): 223-228.
- Harris LG, Foster SJ, Richards RG (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relations to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*. 4(2): 39-60.
- Henderson A (1995). *The palms of the Amazon*. New York: Oxford University Press, p.323.
- Henderson AJ, Galeano G, Bernal R (1995). *Field Guide to the palms of the Americas*. Princeton: Princeton University Press. 352.
- Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Doma E (2003). Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol and Immunol.* 18: 302-308.

- Karkowska-Kuleta J, Rapala-kozik M & Kozik A (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*. 56: 211-224.
- Koneman EW et al. (2001). Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro. 589-659.
- Kumar CPG, Menon T, Rajasekaran S, Sekar B, Prabu D (2008). Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India. *Mycoses*. 52: 44-4.
- Linnaeus C (1753). *Systema naturae, sive regna tria naturae systematice proposita per classes, ordines, genera, & species*. Haak, Leiden.
- Lorenzi GMAC (2006). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae Bases para o Extrativismo. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 156f.
- Lorenzi H (2002). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 1: 275.
- Lu JJ, Lee SY, Chiueh TS (2004). In vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* blood isolates and avaluation of the E-test method. *J Microbiol Immunol Infect*. 37:335- 42.
- Mims CA, Playfair JH, Roitt IM, Wakelin D, Williams R (1995). *Microbiologia médica*. São Paulo: Manole.18-38.
- Miranda IPD, Rabelo A (2008). *A. Guia de Identificação de palmeiras de Porto de Trombetas - PA*. Editora INPA.
- Mirisola Filho LA (2009). *Cultivo e Processamento do coco macaúba para produção de biodiesel*. Viçosa: Centro de Produções Técnicas. 336 p.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente (2009). *Promoção Nacional da Cadeia de Valor do Coco Babaçu, Brasília*. 9p.
- Moore HE (1973). The major groups of palms and their distribution. *Gentes Herb*. 11: 27-114.
- Murray PR (1995). *Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis*. In: *Manual of Clinical Microbiology* 6th ed.

- Murray PR et al. (2004). *Microbiologia médica*. 4 ed. Guanabara Koogan, 2004. 220-223.
- Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinsk TI, Azeredo J, Oliveira R (2010). Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* 169:175-82.
- Odds FC, Gow NAR, Brown AJP (2006). Toward a molecular understanding of candida albicans virulence. In *molecular principles of fungal pathogenesis*. Heitman J, Filler G, Edwards JE Jr, Mitchell AP, Eds, PP 305-319. ASM Press, Washington DC.
- Oliveira AIT, Alexandre GP, Mahmoud T (2013), Babaçu (*Orbignya* sp): Caracterização física de frutos e utilização de solventes orgânicos para extração de óleo. *Biochemistry and Biotechnology Reports*. 2(3): 1229.
- OMS – Organização Mundial da Saúde (2002). *Traditional Medicine Strategy 2002-05*. World Health Organization (WHO). Genebra. 9-18.
- Palleroni NJ (1998). Introduction to the aerobic pseudomonads. In: Collier, L; Balows, A.; Sussman, M. (eds). *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections – Systematic bacteriology*. 2: 1091-1108.
- Panizo MM, Revia'kina V, Dolande M, Selgrad S (2009). *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *MedMycol* 47:137–43.
- Pavlak MC, Zuniga AD, Lima TLA, Arévalo-Pinedo A, Carreiro SC, Fleury CS, Silva DL (2007). Aproveitamento do farelo do mesocarpo do babaçu (*Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. *Revista Evidência*. 7(1): 7-24.
- Pfaller MA, Diekema DJ (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 20:133-163.
- Pinheiro CUB (2011). *Palmeiras do Maranhão: Onde canta o sabiá*. Editora Aquarela. São Luís. 167-174.

- Pinto A, Amaral P, Gaia C, Oliveira W (2010). Boas práticas para manejo florestal e agroindustrial de produtos florestais não madeireiros: açaí, andiroba, babaçu, castanha do Brasil, copaíba e unha de gato. Imazon. 194.
- Ramos M I L; Ramos Filho M M, Hiane P A, Braga Neto J A, Siqueira E D A (2008). Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva (Jacq.) Lodd. Ciênc. Tecnol. Aliment. 28(Supl.): 90-94.
- Resende ILM, Santos FP, Chaves LJ, Nascimento JL (2012). Estrutura etária de populações de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) de veredas da região central de Goiás, Brasil. Revista *Árvore*. 36: 103- 112.
- Santos ACDM et al. (2009). A virulência de *Escherichia coli* extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. *Mundo Saúde*, 33(4) 392-400.
- Santos NQ (2004). A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto contexto enferm*. 13: n. spe.
- Scariot A (1998). Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. *Principes*, Brasília. 42(1): 5-8.
- Silva CJ, Barbosa LCA, Demuner AJ, Montanari RM, Pinheiro AL, Dias I, Andrade NJ (2010). Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae plantadas no Brasil. *Química Nova*. 33(1). São Paulo 2010 Nova, v.33, n.1, 2010. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil
- Sodré JB (2005). Morfologia das palmeiras como meio de identificação e uso paisagístico. Monografia- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 62f.
- Teixeira LM, Facklam RR (2003). *Enterococcus*. In: Murray PR et al. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. 422-33.
- Teixeira MA (2002). Biomassa de babaçu no Brasil. In: Encontro de Energia no Meio Rural. Caderno de Resumos. Anais. AGRENER 2002.

Teixeira MA, Carvalho MG (2007). Regulatory mechanism for biomass renewable energy in Brazil, a case study of the Brazilian Babassu oil extraction industry. *Science Direct*. 3(2): 999-1005.

2. ARTIGO I – CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF PALM LEAF EXTRACTS FROM BABAÇU (*ATTALEA SPECIOSA*), BURITI (*MAURITIA FLEXUOSA*), AND MACAÚBA (*ACROCOMIA ACULEATA*).

Adriana Idalina Torcato de Oliveira,¹ Talal Suleiman Mahmoud,² Guilherme Nobre L. do Nascimento,³ Juliana Fonseca Moreira da Silva,¹ Raphael Sanzio Pimenta,¹ and Paula Benevides de Morais¹

¹Laboratorio de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO), Universidade Federal do Tocantins, 77001-923 Palmas, TO, Brazil

²Centro de Estudos do Mar (CEM), Federal University of Parana, 83255-976 Pontal do Paraná, PR, Brazil

³Laboratory of Basic and Health Sciences, Federal University of Tocantins, 77001-923 Palmas, TO, Brazil

Correspondence should be addressed to Adriana Idalina Torcato de Oliveira; dritorcato@gmail.com

Received 19 April 2016; Revised 14 June 2016; Accepted 4 July 2016

The Scientific World Journal. ISSN: 1537-744X

ABSTRACT

Babaçu (*A. speciosa*), Buriti (*M. flexuosa*), and Macaúba (*A. aculeata*) are palm trees typical of the ecotone area between Cerrado and the Amazon rainforest. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the extracts prepared from the leaves of those palms as well as determine their chemical compositions. The ethanol extracts were prepared in a Soxhlet apparatus and tested by disk diffusion and agar dilution technique against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and *Candida parapsilosis*. However, there was no significant activity at concentrations of 25,

50, and 100 mg·mL⁻¹. Moreover, the phytochemical analysis revealed the presence of tannins, flavonoids, catechins, steroids, triterpenes, and saponins. Gas chromatography (GC/MS) analysis also identified organic acids, such as capric (decanoic) acid, lauric (dodecanoic) acid, myristic (tetradecanoic) acid, phthalic (1,2-benzenedicarboxylic) acid, palmitic (hexadecanoic) acid, stearic (octadecanoic) acid, linoleic (9,12-octadecadienoic) acid (omega-6), linolenic (octadecatrienoic) acid (omega-3), and the terpenes citronellol and phytol. Based on the chemical composition in the palm leaf extracts, the palms have the potential to be useful in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries.

2.1. INTRODUCTION

Brazil owns 20% of all the biodiversity in the world [1]. Unfortunately, only 10% of all plant species have been included in chemical or biological studies [2]. Generally, the therapeutic use of plants is known by conventional wisdom. However, this use should be based not only on observation but also on the results of scientific experimentation [3]. The pharmacological activity of a plant is attributable to one or more active chemical substances found in the plant tissue [4]. The phanerogams produce chemical compounds via primary and secondary metabolism. Secondary metabolites are compounds that play an important role in plant survival, providing a defense mechanism against predation by insects, herbivores, and microorganisms [5]. The Arecaceae family includes several important tropical plants, especially palm trees. Many authors consider the Arecaceae family of plants to be the most important in the life of forest people [6]. In addition, biodiversity of the palm flora of Brazil is quite rich, with an estimated 221 species [7] and 39 genera, the majority of which are found in the Amazon forest. Furthermore, in Tocantins state, it is possible to find several species of palms, including *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Macaúba), *Attalea speciosa* Mart. Ex Spreng. (Babaçu), *Mauritia flexuosa* L.f. (Buriti), and others [8] (Figure 1). Given the lack of scientific research on these palm species, this work aims to study the chemical properties and evaluate antimicrobial activity related to the ethanolic extracts obtained from their leaves.

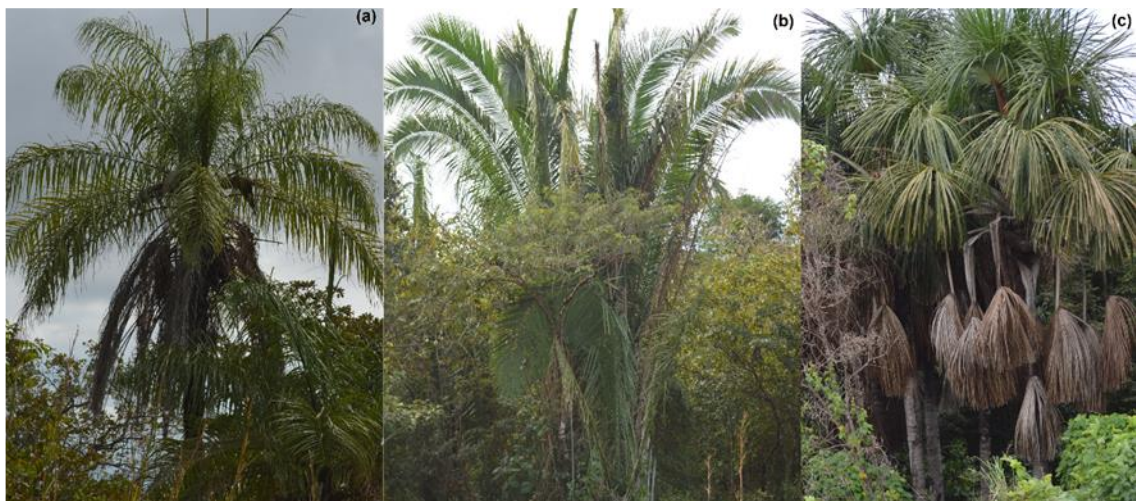


Figure 1: Photos personal file. (a) *Acrocomia aculeata*. (b) *Attalea speciosa*. (c) *Mauritia flexuosa*.

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Sample Preparation and Extraction Using Solvent.

Plant samples from the palm trees *A. speciosa*, *M. flexuosa*, and *A. Aculeata* were made in April 2015 at Escola de Medicina Veterinaria e Zootecnia, EMVZ Campus (7°06'46.8"S 48°11'34.6W) of the Universidade Federal do Tocantins (UFT). Control species were located in the Herbarium HTO of UFT with the following registry numbers: *Attalea speciosa* (10.953), *Mauritia flexuosa* (10.952), and *Acrocomia aculeata* (10.954). In addition, dry material of the palm trees was obtained from green leaves that were cut using common scissors and dried in an oven (FANEM, Sao Paulo, Brazil) at 45–48 °C for 6 hours. The moisture content of the samples was determined based on the methods of Institute Adolf Lutz [9]. The percent humidity ($U\%$) for each species was calculated according to the following formula:

$$U\% = \left[\frac{(\text{Green material} - \text{dry material})}{\text{green material}} \right] * 100. \quad (1)$$

The extraction of the chemical compounds was performed using a Soxhlet extractor [10]. The dry material (leaves) was weighed directly in cellulose thimbles (Babaçu: 8.595 g, Buriti: 7.050 g, Macauba: 10.004 g) and then was loaded into the Soxhlet. All extractions used 250 mL of ethanol (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brazil) as the solvent, and the extraction was carried out over 5 hours with the water cooling system set to 18°C. Ethanol is a solvent capable of extraction of a wider group of both polar and apolar compounds such as organic acids, essential oils, lipids, and pigments. It also presents a low toxicity being considered a less aggressive solvent. After extraction, the solvent was removed by rotary evaporation (CIENLAB, Sao

Paulo, Brazil). The yield ($R\%$) of each extract was calculated based on the amount of dry matter according to the following equation:

$$R\% = \left[\frac{Mo}{Bm} - \frac{(Bm \cdot U)}{100} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

2.2.2 Phytochemical Screening

The phytochemical screening of extracts was performed in triplicate to identify secondary metabolites, such as tannins, flavonoids, catechins, carotenoids, organic acids, cardioactive glycosides, steroids and triterpenoids, saponins, sesquiterpene and other lactones, azulenes, coumarins, alkaloids and anthraquinones [10].

2.2.3 Antimicrobial activity

To evaluate the antimicrobial activity of the extracts, we used standard strains (American Type Collection Culture – ATCC) that were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil). The Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) and the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) that are extensively used for antimicrobial tests of plant compounds were used. Additionally, *Candida albicans* (Access number 4006) and *Candida parapsilosis* (Access number 40038), which are yeast fungi, were included in the test. The methodology was based on the disk diffusion method of Kirby-Bauer and the procedure was performed following the Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test [11]. The extracts were diluted in a mixture with dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brazil), Tween-80 emulsifier 0.02% (Synth, São Paulo, Brazil), and saline solution 0.9% [12]. The concentrations of the final solutions for each

extract were: 100.0 mg.mL⁻¹, 50.0 mg.mL⁻¹, and 25.0 mg.mL⁻¹. Disks treated with 10% DMSO were used as the negative control, while the positive control disks were treated with gentamicin (10 µg/disk), chloramphenicol (30 µg/disk) or fluconazole (30 µg/disk). Müller-Hinton agar (bacteria) and Sabouraud Dextrose Agar (fungi) were used as growth media.

2.2.4 GC/MS

The chemical compounds in the plant extracts were derivatized (transesterification reaction) through acid catalysis of boron trifluoride in methanol with heat conditions according to Meyer et al. (2006) [13]. The analyses were performed using a Shimadzu type GC/MS QP, 2010 Plus Model, which has a capillary column of fused silica HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). The heating was ramped between 60 to 240°C at rate of 3°C/min. The injector temperature was 250°C in the splitless mode, and helium gas was used at a speed of 1.2 mL.min⁻¹. The electron energy was 70 eV, and the temperature of the ion source was 200°C. Finally, the identification of compounds was made by comparison of the peak mass data with the data in the NIST-08 (National Institute of Standards and Technology) library.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

The humidity percentage of the palm trees was 47.23% for Babaçu, 38.79% for Buriti and 57.93% for Macaúba. These high humidity percentages are attributable to harvest during the rainy season. The extraction method using a Soxhlet extractor [14] resulted in a yield of 28.19% for *A. speciosa*, 33.14% for *M. flexuosa* and 66.39% for *A. aculeata* were shown in Figure 2. This is probably due to the part of the leaves used, since the extraction was made from *A. aculeata* folioles whereas in *A. speciosa* and *M. flexuosa* the whole leaf was used that included

the blade with midrib and the petiole. This resulted in a drier and more powdery substrate of *A. aculeata* for the solvent to work.

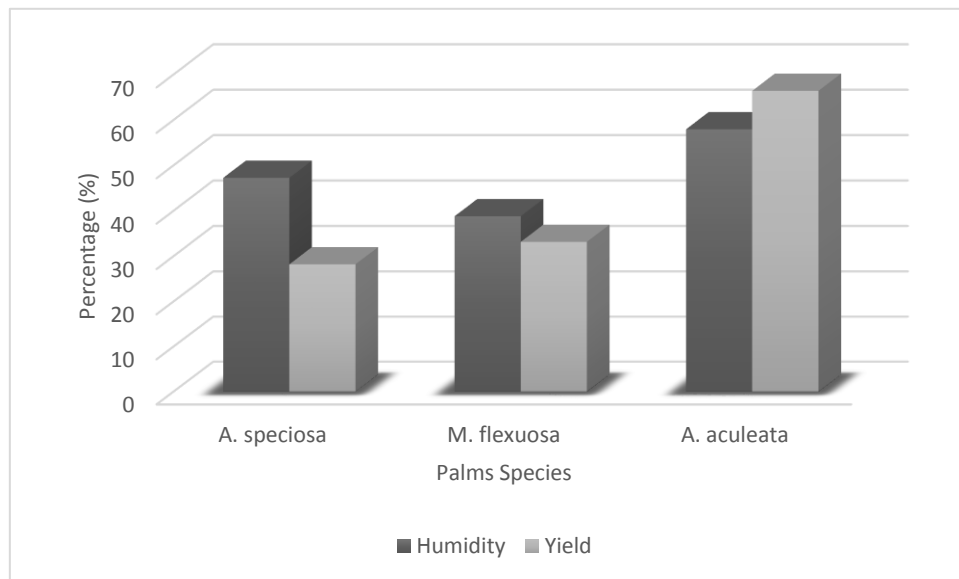


Figure 2: Humidity and yield extraction for *A. speciosa*, *M. flexuosa* and for *A. aculeata*.

The phytochemical screening of the leaf extracts from *M. flexuosa* and *A. aculeata* revealed the presence of tannins, flavonoids, catechins, steroids and/or triterpenoids and saponins. However, the extract from *A. speciosa* revealed only flavonoids, steroids and/or triterpenoids and saponins. These results indicate that the leaves of the palm trees that were studied have promise for scientific use due to their secondary metabolites, which have biological and pharmacological activities that were found in the analysis.

The antimicrobial activity of the chemical compound found in the leaves of *A. speciosa*, *M. flexuosa* and *A. aculeata* was tested against four bacterial strains and two strains of leveduriform fungi; both are pathogens for humans and showed no sensitivity to the extracts. While the positive controls showed the expected zones of inhibition, there was no significant antimicrobial activity against the tested microorganisms based on the agar-diffusion results. The selection of microorganisms was made to verify the antimicrobial activity of the extracts.

However, further tests using other strains, including plant pathogens, or the use of alternative methods should be considered.

Gas chromatography analysis of *A. speciosa*, *M. flexuosa* and *A. aculeata* leaf extracts showed ten (10) chemical compounds (Table 1) that are known to have biological and pharmacological properties.

TABLE 1: The major chemical compounds detected (Area, %) and retention time (RT) in the leaf extracts of *A. speciosa*, *M. flexuosa* and *A. aculeata* by GC/MS analysis.

Compounds	<i>A. speciosa</i>		<i>M. flexuosa</i>		<i>A. aculeata</i>	
	RT (min)	Area %	RT (min)	Area %	RT (min)	Area %
Capric acid, C _{11:0}	20.416	2.26	20.429	2.64	nd	-
Lauric acid, C _{12:0}	nd	-	28.925	1.29	nd	-
Myristic acid, C _{14:0}	nd	-	36.727	1.28	nd	-
Phthalic acid, C ₆ H ₄	nd	-	41.883	1.54	41.866	1.29
Palmitic acid, C _{16:0}	43.927	3.27	43.861	20.35	43.816	12.12
Phytol, C ₂₀ H ₄₀ O	nd	-	47.515	6.28	47.483	2.44
Citronellol, C ₁₀ H ₂₀ O	48.408	7.65	48.437	11.75	48.401	7.63
Linoleic acid, C _{18:2} (ω6)	49.282	4.62	49.317	5.61	49.280	3.84
Linolenic acid, C _{18:3} (ω3)	49.515	20.65	49.540	19.94	49.501	18.92
Stearic acid, C _{18:0}	50.291	1.93	50.320	3.82	50.291	2.78

RT: retention time in minutes; Area: proportional peak area; nd: not detected.

The identified compounds represent a mixture of esters derived from saturated fatty acids, unsaturated, aromatics and terpenes. The extract of *M. flexuosa* showed the highest percentage of saturated fatty acids, which are responsible for food palatability. Palmitic acid and hexadecanoic acid were found in higher concentrations in *M. flexuosa* (20.35%) and *A. aculeata* (12.12%) extracts. These fatty acids are particularly useful for improving the textural properties

of foods and are used in the cosmetic industry. Moreover, the linolenic fatty acid (octadecatrienoic acid) and linoleic acid (9,12-octadecadienoic acid) are the most important finding because they are essential fatty acids (EFAs). The three analyzed palm trees showed a ratio of linolenic/ linoleic acid between 4:1 - 5:1, which is the most recommended for human nutrition by leading regulatory agencies in the world, including the Scientific Review Committee (SRC) and the World Health Organization (WHO) [15]. The phytol (3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) was found at a low concentration both in *M. flexuosa* (6.28%) and in *A. aculeata* (2.44%) extracts and is a component of the chlorophyll molecule, which is present in green leaves of various medicinal plants and used by the cosmetic industry. The natural acyclic monoterpene citronellol is a GRAS substance (Generally Recognized as Safe for food use) and has been found in several plants reported to have antifungal, antibacterial, antispasmodic and hypotensive properties [16]. For this reason, the presence of terpenes revealed in the phytochemical analysis were confirmed.

2.4. CONCLUSION

The use of ethanol has proved to be very favorable due to its low cost, its ability to be obtained by biotechnological processes and its low toxicity [17, 18]. Although phytochemical tests did not reveal the presence of organic acids, they were verified by gas chromatography, which is a more precise method, especially when a compound is present in low concentrations. Considering this, the chemical composition of the palm tree leaves that were studied requires special consideration and attention in their interpretation. While they may vary due to environmental and/or genetic factors, this study contributes to the knowledge of the species and the expansion of its application in biotechnology. In summary, the results obtained contribute to a better understanding of the relationship between the chemical composition present in the leaves of palm trees and their scientific potential.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express sincere thanks to the Analytical Center of the Institute of Chemistry (IQ) from the University of Brasilia (UNB) and Dr. Maria Lucilia dos Santos.

2.5 REFERENCES

- [1] M. C. Pagano, M. R. Scotti. “Effect of phosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of *Zeyheria tuberculosa* a native species in Brazil’s forest,” *Middle-East J. Sci Res*, vol. 6, no. 6, pp. 604-611, 2010.
- [2] T. A. Aversi-Ferreira, P. P. Ribeiro, N. C. Silva, L. D. Brandão, L. H. A. Gratão, E. Nyamdavaa, R. A. Aversi-Ferreira, H. Nishijo, G. N. L. Nascimento, “Confrontation between ethnopharmacology and scientific results of the herbal medicaments from Brazil to be applied in primary health care,” *J. Med. Plants Res.*, vol. 7, no. 14, pp. 845-856, 2013.
- [3] R. Verpoorte, R. Wander Heijden, J. Memelink. J. “Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production,” *Transgenic Res*, vol. 9, pp. 323-343, 2000.
- [4] P. J. Sixel; N. R. Pecinalli. “Características farmacológicas gerais das plantas medicinais,” *Infarma*, vol. 16, no.13-14, pp.74-77, 2005.

- [5] M.A.B. Passos, M.S. Mendonça. “Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em três fases de desenvolvimento,” *Acta Amazonica*, vol. 36, no. 4, pp. 431-436, 2006.
- [6] A. Henderson, G. Galeano, R. Bernal. “Field guide to the palms of the Americas,” *New Jersey: Princeton University Press*, vol. 16, pp. 18, 1996.
- [7] J. F. Ribeiro, B. M. T. Walter. “As Principais Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: S. M. Sano, S.P. Almeida, J. F. Ribeiro. Cerrado: ecologia e flora.” Brasília, DF: *Embrapa Informação Tecnológica* pp. 151-212, 2008.
- [8] Instituto Adolfo Lutz. “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos”. *Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Série A – Normas e Manuais Técnicos)*. 4.ed. pp.1018, 2005.
- [9] F. Soxhlet, “Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes,” *Polytechnisches Journal*, vol. 232, no.5, pp. 461-465, 1879.
- [10] F. J. A. Matos, “Introdução à fitoquímica experimental” *Fortaleza: Edições UFC*, 2.^a ed., pp. 141, 1997.
- [11] NCCLS, “Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests,” Approved Standard—Eighth Edition. *NCCLS document M2-A8*, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- [12] F. C. Groppo, J. C. Ramacciato, R. P. Simões, F. M. Flório, A. Sartoratto, “Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms,” *Int Dent J*, vol. 52, pp. 433-437, 2002.
- [13] L. C. Meher, D. V. Sagar, S. N. Naik, “Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol.10, no.3, pp. 248- 28, 2006.

- [14] D. T. Raspe, L.C. Filho and C. S. Silva, "Effect of Additives and Process Variables on Enzymatic Hydrolysis of Macauba Kernel Oil (*Acrocomia aculeata*)," *International Journal of Chemical Engineering*, vol. 2013, pp 1-8, 2013.
- [15] C. A. Martin, V. V. Almeida, M. R. Ruiz, J. E. L. Visentainer, M. Matshushita, N. E. Souza, J. V. Visentainer, "Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods," *Rev. Nutr.*, Campinas, vol.19, no. 6, pp. 761-770, 2006.
- [16] J. P. Costa, N. V. Lourenço, C. C. M. P. Santos, A. R. Tomé, G. F. S. Sousa, D. P. Sousa, R. N. Almeida, R. M. Freitas, "Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol," *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, vol.33, no. 3, pp.421-428, 2012.
- [17] J. F. A. Bastos, I. J. Moreira, T. P. Ribeiro, I. A. Medeiros, A. R. Antonioli, D. P. De Sousa, M. R. Santos, "Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*," vol. 106, no. 4, pp 331-337, 2010.
- [18] A. I. T Oliveira, G. P. Alexandre, T. S. Mahmoud, .BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports - Número Especial v. 2, no. 3, pp. 1229, 2013.

3. ARTIGO II – IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND FATTY ACID COMPOSITION THROUGH GC-MS OF ETHANOL EXTRACTS OF MAURITIA FLEXUOSA (BURITI) FRUITS

Adriana Idalina Torcato de OLIVEIRA^{1*}; Jhonatha Barros CABRAL¹, Talal Suleiman MAHMOUD², Guilherme Nobre L. do NASCIMENTO³, Juliana Fonseca Moreira da SILVA¹, Raphael Sanzio PIMENTA¹, and Paula Benevides de MORAIS¹.

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO), Universidade Federal do Tocantins, PO Box 114, 77001-923, Palmas, TO, Brazil.

²Centro de Estudos do Mar (CEM) – Universidade Federal do Paraná - UFPR. 83255-976. Caixa Postal: 61. Av. Beira Mar, s/n, Balneário Pontal do Sul. Pontal do Paraná, PR, Brazil.

³Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Tocantins - UFT, 77001-923, Palmas, TO, Brazil.

Received 3 August, 2017; Accepted 5 October, 2017

Journal of Medicinal Plants Research. ISSN: 1996-0875

ABSTRACT

In this study, the chemical composition of the peel and pulp of *Mauritia flexuosa* fruits were analyzed and the antimicrobial activity of ethanolic extracts from these fruits was evaluated using *in vitro* tests. Chemical composition analysis with GC-MS indicated the presence of saturated and unsaturated fatty acids. The peel extracts

(ECBU) presented 54.41% and the pulp (EPBU) presented 94.05% of the saturated fatty acids lauric, myristic, palmitic, stearic, oleic and linoleic acids. The antimicrobial activities were performed using the diffusion and micro-dilution (MIC) methods. ECBU was active against the bacteria *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* at a concentration of 200 mg mL⁻¹, but it was not active against the yeasts *C. albicans* and *C. parapsilosis* using the diffusion method. The MIC results showed that ECBU was active against the tested bacteria at concentrations > 12.5 mg mL⁻¹ and EPBU was active at concentrations > 25.0 mg mL⁻¹. This was probably due to higher sensibility of the method. The results indicated that the peel and pulp extracts of *M. flexuosa* present antibacterial activity and that ECBU is an especially promising potential candidate for the prospection of new pharmaceutical compounds.

Keywords: *Mauritia flexuosa*, Buriti, anti-bacterial agents, fatty acids.

3.1 INTRODUCTION

The vast availability and indiscriminate use of antimicrobial compounds has led to selection of micro-organisms that are resistant to these drugs. These drugs exert influence both in the patient under treatment and the ecosystem, with significant repercussions in the result of the disease and also in the increase in resistant environmental bacterial strains and species (Avorn and Solomon, 2000). In order to supply an increasing demand for new antimicrobial drugs, research on new sources of substances, including plants, has grown (Caetano et al., 2002). Bioactive compounds from plants have presented high specificity against a broad spectrum of bacteria (Dixon, 2001). The Cerrado and Amazonian biomes present 20% of all the biodiversity in the world (Calixto, 2005), which includes great diversity of plants with well-known therapeutic properties and chemicals that can be used in biological studies. *Mauritia flexuosa* L.f. (buriti) belongs to the Arecaceae family and it is considered one of the most abundant oleaginous palms in Brazil, where it is native. The fruits of buriti are spherical or oval with seasonal fruiting (Storti, 1993), are rich in vitamin A and carotenoids which gives them their characteristic yellowish/reddish color (Albuquerque et al., 2003) and are traditionally consumed *in natura* (Barbosa et al., 2010). The commercialization of products from this palm tree in regions where it is native provides income for the local population and helps maintain the integrity of the “veredas” ecosystem, its main habitat. The indigenous Brazilian people call this species "the tree of life", due to the use of most of its parts, from the leaves to the root. Ribeiro et al. (2014) found 40 different uses for buriti among traditional native communities in Northwest Brazil. The studies of bioactive compounds with antimicrobial activities from buriti fruits are very rare. Buriti oil is reported as presenting antimicrobial properties as a soap formula (Soares, 2017). Koolen et al. (2013) and Batista et al. (2012) showed antimicrobial activity of extracts of leaves, trunk and fruits of *Mauritia flexuosa*. Mendonça Filho and Pereira (2012) report antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* by seeds of two other Amazonian palms, *Eutherpe oleracea* and *Bactris gassipaes*. Barros et al. (2014) showed that buriti cream was effective in

healing of skin lesions in mice. Due to the economic importance of *M. flexuosa* for indigenous Brazilian people, the objective of this study was to carry out *in vitro* antimicrobial activity tests of the ethanol extracts from the pulp and the fruit peel against human pathogens and to analyze the chemical composition of the fatty acids presented in gas chromatography coupled to a mass spectrometer. There are few studies on the antimicrobial activities of the chemical components (GC-MS) of the peel and pulp of this palm tree's fruits.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Chemicals

Ethanol, aluminum chloride (AlCl_3), Sodium chloride (NaCl), and Dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mueller Hinton Broth and Sabouraud culture media were obtained from Kasvi (Curitiba, Paraná, Brazil). The used water used in all analyses was ultrapure produced by a Milli-Q, Millipore system (Bedford, USA). Other reagents used in this study were of analytical grade.

3.2.2 Plant materials

Ripe fruits were collected from *M. flexuosa* (Figures 1a, b) in October 2015, in “vereda” (“veredas” are well-defined ecosystems that occur within the Brazilian Cerrado biome, and are characterized by the presence of buriti palm trees in semi-waterlogged conditions) site in the State of Tocantins, Brazil (9°58'2.078934”S 48°17'28.64502”W), at an altitude of 488m. A voucher specimen of *Mauritia flexuosa* (10.952) was deposited at the HTO herbarium of *Universidade Federal do Tocantins* (Federal University of Tocantins - UFT).

3.2.3 Sample preparation

The *M. flexuosa* fruit peels were removed manually after immersing the fruit in warm distilled water (40 °C), and were separated from the pulp using a stainless steel knife (Figures 1c to e). Then the materials were dried in an oven with air circulation (Fanem, São Paulo, Brazil) at 40

°C for 48 h and crushed in a home processor (Arno, São Paulo, Brazil). Samples of approximately 10 to 30 g were weighed on a precision analytical scale (Shimadzu do Brazil, São Paulo, Brazil) and placed in cellulose cartridges in a Soxhlet apparatus with 200 mL of ethanol solvent (Vetec, 99.8% P.A.) for extraction over five h. In the end of the process, the solvent was removed using a rotary evaporator (Cienlab, São Paulo, Brazil) with a reduced pressure of 45 °C. The crude extracts from buriti's pulp (EPBU) and peel (ECBU) were stored in a sterile bottle and refrigerated (10 – 15 °C).



Figure 1. *Mauritia flexuosa* is a palm tree it grows in and near swamps and other wet areas (a), ripe fruit (b), Fruit immersed in water (c), peeled fruit (d), and (e) shells separated for drying. Photos by the author.

3.2.4 GC – MS

In order to analyze the chemical compounds presented in the plant extracts, they were derivatized (esterification reaction) by acid catalysis of boron trifluoride in methanol with

heating (Meher et al., 2006). Analyses were carried out using a Shimadzu GC/MS QP Model 2010 Ultra chromatograph equipped with an HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) fused silica capillary column. Standards for the GC – MS were saturated alkanes (C₁₁ - C₄₀) The program temperature for the standards used was 50 °C (0 min); 5 °C min⁻¹ reaching 310 °C (20 min), in which the retention time of C₁₁H₂₄ is 10.020 min and that of C₁₃H₂₈ is 15.535 min in Split mode: 1:25. The heating ramp had been programmed for a temperature range of 50 °C (0 min); 5 °C min⁻¹ up to 300°C (10 min) at a speed of 3 °C min⁻¹. Injection temperature: 300 °C; Interface temperature: 250 °C in Split mode: 1:25. Helium gas was used as a carrier gas at a speed of 1.2 mL min⁻¹. The energy of the electron was 70 eV and the temperature of the ion source was 250 °C. The compounds were identified by comparing the mass spectrometer and their GC retention data with standards. Further identifications were made by comparing the mass spectrometer with those of the NIST-08 (National Institute of Standards and Technology) libraries and those cited in the literature (Adams, 2017).

3.2.5 Antimicrobial Assays

ATCC-type strains (American Type Collection Culture) were kindly provided by collection from the National Institute for Quality Control in Health at the Oswaldo Cruz Foundation (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brazil). The used bacteria used were: *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and the yeasts used were: *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), microorganisms that are usually recommended for use in antimicrobial assays (Alves et al., 2008, Silva et al., 2012).

Antimicrobial Sensitivity Testing

The antimicrobial assays were performed in triplicate using the well diffusion method (CLSI, 2012) in Petri (140 X 15 mm) dishes with 50 mL of Muller Hinton Agar medium for bacteria

and the same amount of Saboraud Agar medium for the yeast tests. Inoculum solutions were prepared using 3 to 4 colonies of the isolated strain in plates and diluted in 0.85 % saline solution before reaching the corresponding turbidity of 0.5 on the McFarland scale (CLSI, 2003a). That is, around 1.5×10^8 Colony Forming Units (CFU.mL⁻¹) of bacteria and 2.0×10^6 CFU mL⁻¹ (Pelissari et al., 2010) of yeasts. A 10% solution of Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as the negative control, and 30 µg mL⁻¹ of Fluconazole for the yeasts or 30 µg mL⁻¹ of Chloramphenicol for the bacteria was used as the positive control. The solutions containing the inocula were swabbed on the surface of the media and the wells were made with a sterile cork borer. The wells were then filled with 50 µL of the tested extract diluted in 10 % DMSO at concentrations of 200, 100 and 50 mg mL⁻¹, and with the positive and negative controls. After 24 h of incubation at 37 °C (bacteria) and 25 °C (yeasts), the microbial growth inhibition halos were measured in millimeters with a digital caliper.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was done using the broth microdilution technique as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Lima et al., 2006). The tests were performed in a “sensitive microtiter” plate with 96 sterile wells only for microorganisms that presented inhibition in the well test (*E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*). Initially, 100 µL of Muller Hinton growth medium was added to each well, followed by the extracts that were added by performing serial dilution as recommended by Benfatti (2010), thus obtaining a range of concentrations of the pulp or peel extracts (50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.56; 0.78; 0.39 mg.mL⁻¹). A solution of 2000 µg mL⁻¹ of Chloramphenicol was used as the positive control, leading to serially diluted concentrations of 1000; 500; 250; 125; 62.5, 31.25; 15.625; 7.8 µg mL⁻¹. The negative control was 10 % DMSO. Bacteria viability was tested using serial dilutions from a starting solution of 10⁷ CFU mL⁻¹. In addition, control of media sterility was also executed. The 5 µL inoculum of the 10⁷ CFU mL⁻¹

bacterial solution was added to all except the sterility control wells. The plates were covered with plastic film and incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, 30 µL of a 1 % aqueous reazurine (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) solution was added to each well for 1 h. A resulting blue color in the well was read as growth inhibition and a reddish pink as non-inhibition.

3.3 RESULTS

3.3.1 Extract yields

The yield of the pulp extract (EPBU) was 14.13% and the yield of the peel (ECBU) was 22.30%.

3.3.2 Fatty Acid Determination by Gas Chromatography

The values obtained by gas chromatography for the chemical composition of fatty acids in the crude extracts are presented in Table 1. The ethanolic extracts of *M. flexuosa* fruit peels contained both saturated (55.41 %) and unsaturated fatty acids (44.59 %). The saturated fatty acid was primarily lauric (38.52 %) acid, while unsaturated fatty acids included oleic (41.17 %) and linoleic (2.65 %) acids. The ethanolic extract of the pulp had a high content of saturated fatty acids (94.05 %) and unsaturated fatty acids (5, 95 %). Saturated fatty acids in pulps included lauric (84.08 %), myristic (3.97 %) and stearic (3.98 %) acids, and unsaturated fatty acids including oleic (5.56 %) and linoleic (0.39 %) acids.

Table 1. Fatty acid composition (%) of the ethanol extract from *Mauritia flexuosa* peel (EPBU) and pulp (ECBU)

Fatty acid composition	ECBU % area	EPBU % area
12:0 lauric acid	38.52	84.08
14:0 myristic acid	-	3.97
16:0 palmitic acid	15.20	2.02

18:0 stearic acid	1.69	3.98
18:1 oleic acid	41.17	5.56
18:1 trans-11 vaccenic acid	0.77	-
18:2 linoleic acid	2.65	0.39

3.3.3 Antimicrobial Activity of Crude Extracts

The antimicrobial activity test was performed with the crude ethanolic extracts ECBU and EPBU from *M. flexuosa* (Table 2) in which EPBU showed no inhibition halo against the bacteria tested. The extract ECBU presented an inhibition halo ranging from 0 to 15.5mm for all bacteria at a concentration of 200mg/mL. The largest inhibition halo occurred against *S. aureus* and the smallest against *P. aeruginosa*. At a concentration of 100 mg/mL, all bacteria were inhibited except *P. aeruginosa*. The extract was able to inhibit *E. faecalis* and *S. aureus* at concentrations as low as 50mg/mL, but was not able to inhibit the other tested strains.

Table 2. Mean diameter of growth inhibition (in millimeters (mm)) of bacterial strains in susceptibility tests using the ethanolic extracts ECBU and EPBU (concentration: 50, 100 and 200 mg mL⁻¹) from *M. flexuosa* fruits

Microorganism	Diameter of the inhibition halo (mm)					
	ECBU (mg mL ⁻¹)			EPBU (mg mL ⁻¹)		
	50	100	200	50	100	200
<i>E. faecalis</i>	9.38 mm ± 0.267	11.23 mm ± 0.416	12.88 mm ± 0.181	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	11.63 ± 0.559	14.22 ± 0.498	-	-	-
<i>S. aureus</i>	10.55 mm ± 0.280	12.61 mm ± 0.200	15.50 mm ± 0.434	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	9.56 mm ± 0.223	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-

ECBU = Ethanolic extract from *M. flexuosa* fruit peel, EPBU = Ethanolic extract from *M. flexuosa* fruit pulp.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC results from the extracts ECBU and EPBU are shown in Table 3. The used extract concentrations used in the test ranged from 50mg/mL to 0.39mg/mL. The ECBU extract presented an MIC of 12.5 mg/mL against *E. faecalis*, 25mg/mL against *S. aureus*, and 50 mg/mL against other tested bacteria, with an inhibitory response in lower concentrations than EPBU, which had an MIC between 25mg/mL against *E. coli*, and 50mg/mL against the other tested bacteria.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in mg/mL of crude ethanolic extracts from the peel (ECBU) and the pulp (EPBU) of *M. flexuosa* with antimicrobial activities

Crude Extract	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ECBU	12.5	50	25	50
EPBU	50	25	50	50

3.4 DISCUSSION

The ethanolic extracts obtained from the peels and pulp of *M. flexuosa* fruits were shown to be available and easily obtainable source of antimicrobials active against a range of bacterial strains. The Soxhlet system was chosen to obtain the extracts because it is a standard method in which the temperature and nature of the solvent determine and favor the extraction efficiency of the active compounds. Ethanol was the solvent chosen because it is affordable, it comes from a renewable source, it has low toxicity and it is capable of extracting a wide range of polar compounds and some non-polar compounds (Bastos et al., 2010). EPBU yield was 14.13 %, which is lower than values of 23.55 % found in the literature (Carvalho et al., 2011) probably because the extraction method used hexane as the solvent instead of ethanol for 12h in a Soxhlet

extractor. On the other hand, the ECBU yield of 22.30 % was greater than that found by Fuentes et al. (2013) of 13 % using hexane as the solvent over 8 h.

The differences in yields obtained may be related not only to the nature of the solvents, but also to other factors such as temperature, soil type, humidity, and general sanity of the tree, etc. can cause the plant to produce different substances. For example, Vasquez-Leon et al. (2017) showed that bioactive compounds in *Moringa oleifera* Lam. leaves are influenced by climatic factors, soil, and tree age. Milanez et al. (2018) discussed that buriti fruits harvested at different stages of ripening produced different quantities of total phenolic compounds, especially among fruits harvested at the ripened stage, where the levels of these compounds were higher.

The comparison between extracts the obtained using ethanol and hexane shows that the % of saturated fatty acids (55.41 %) in ethanolic extracts of ECBU was lower than that extracted from the same fruit biomass when using hexane as the solvent (59 %) (Forero-Doria et al., 2016). However, the % of unsaturated fatty acids of ECBU (44.59 %) was higher than what is reported by Darnet et al. (2011) (37.9 %) (Forero-Doria et al., 2016), using hexane as the solvent. The % of lauric acid in the ethanolic extract was higher (38.52 %) than that obtained using hexane as a solvent (0.7 %) (Fuentes et al., 2013). The obtained values for oleic acid (41.17 %) and linoleic acid (2.65 %) from ECBU were similar to the ones shown by Fuentes (2013), 33.4 % for oleic acid and 3.7 % for linoleic acid. Extraction using ethanol is a viable means of obtaining compounds from *M. flexuosa* fruits, especially the unsaturated fatty acids.

EPBU presented a higher % of saturated acids (94.05 %) than the values found in the literature [21.9 % (Darnet et al., 2011) and 21.76 % (Manhães and Sabaa-Srur, 2011)] and a lower % of unsaturated acids (5.95 %) compared to the values obtained for the hexane-extracted substrate (78.01 % and 78.18 %) (Manhães and Sabaa-Srur, 2011). The % of oleic acid (5.56 %) in ethanol-extracted EPBU was below what is commonly found in buriti pulp and lower than in hexane-extracted oil [75.7 % and 73.32 % (Manhães and Sabaa-Srur, 2011)]. The higher

concentration of saturated fatty acids in the two ethanolic extracts (ECBU and EPBU) compared to extracts obtained using hexane is probably explained by the temperature increase during ethanol extraction (P.E. 78.37 °C) as compared to hexane (68 °C), which favored the extraction of the saturated compounds that are more resistant to oxidation and more stable at higher temperatures.

Antimicrobial activity tests were carried out with the agar dilution method that is widely used, since it presents simple execution and low cost, and could easily demonstrate the spectra of activity for both of the tested extracts. ECBU demonstrated activity against both G+ (*E. faecalis* and *S. aureus*) and G- strains (*E. coli* and *P. aeruginosa*), which indicates broad spectrum inhibitory activity against bacteria. However, it did not show activity against the yeasts tested (*C. albicans* and *C. parapsilosis*). The literature (Batista et al., 2012) reported an inhibition activity for the *M. flexuosa* pulp extract obtained with hexane extraction against *S. aureus* ATCC 6538. Silveira (2005) showed that both ethanolic and hexanic extracts of *M. flexuosa* fruits were active against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, but did not significantly inhibit *E. coli*.

Huang et al. (2011) demonstrated that fatty acids exhibit patterns of inhibition against oral bacteria with specificity that relates more to the bacterial species than the general structural characteristics of the microorganisms. This study also showed that fatty acids were much less effective against *C. albicans* than the oral bacteria, with effectiveness limited to hexanoic, octanoic, and lauric acids (Huang et al., 2011). We were not able to correlate the fatty acid composition to the halo of antimicrobial activity of the fruit since crude extracts were used for the testing of antimicrobial activity. Further studies of the antimicrobial activity of the combined or isolated fatty acids detected are needed to allow correlation of inhibition zone and fatty acid composition. It is also possible that the inhibition may be correlated not to a specific compound but to conjugated groups. Sugar based surfactants conjugated with fatty acid chains are an emerging broad group of highly biocompatible and biodegradable compounds with

established and potential future applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. Lucarini et al. (2016) showed that synthetic lactose palmitoleate and lactose nervonate were shown to exhibit antimicrobial activity versus eight pathogenic species belonging to G+ and G- microorganisms and fungi.

EPBU showed no activity against the bacteria when tested with the well diffusion method. This result is different from (Mekonnen et al., 2016) probably because conditions in this experiment such as the extraction solvent and the microbial species and strains differed from other studies. The same EPBU extract presented a positive result in the MIC test and this may be related to the fact that this method allows for greater solubility of polar compounds (Miranda-Arámbula et al., 2017) that are present in the extract and better dispersion favoring interaction with the tested microorganisms (Valgas et al., 2007). It is also approximately 30 times more sensitive than the other methods described in the literature (Ostrosky et al., 2008). The MIC is widely used for simplicity, low cost, reproducibility, sensitivity and for using a minimum amount of reagents, which allows for a greater number of replicates, increasing the reliability of the results and leaving a permanent record.

The presence of fatty acids in *M. flexuosa* extracts could have contributed to their antimicrobial activity. The antimicrobial effect of these acids occurs because they affect the cell wall, interfering with mechanisms of bacterial virulence such as the prevention of biofilm formation and inhibition of toxin and enzyme production (Ogidi et al., 2015). The entire process of investigation that included information retrieval, botanical identification of the species, research and experimentation provides subsidies for the production of efficient and inexpensive products. In addition, it could also be a social and economic reinforcement for families in the regions where the fruit is found and widely consumed.

3.5 CONCLUSION

Buriti (*M. flexuosa*) fruits and their products present great economic and social importance in the geographic areas where this plant is autochthonous. The obtained ethanolic extracts from the pulp and peel of these fruits showed antibacterial activity against the human pathogens studied. The gas chromatographic analysis (GC-MS) identified the fatty acids: lauric, myristic, palmitic, stearic, oleic and linoleic. Therefore, this study concludes that ECBU and EPBU present potential for pharmaceutical and technological applications due to the presence of bioactive compounds with antibacterial activity and it has brought forward new information on the biotechnological potential of this Brazilian palm tree.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

ABBREVIATIONS

ECBU, Ethanolic extract of buriti bark; **EPBU**, Ethanolic extract of buriti pulp; **MIC**, Minimum Inhibitory Concentration; **G+**, Gram positive; **G-**, Gram negative; **GC-MS**, gas chromatography coupled to mass spectrometer; **DMSO**, Dimethylsulfoxide; **ATCC**, American Type Collection Culture; **CFU**, Colony Forming Unit; **CLSI**, Clinical and Laboratory Standards Institute.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their acknowledgement to the Chemistry Department, Center of Technological Sciences (CCT) from Santa Catarina State University (UNIDESC) for the use of its premises for GC/MS analyses and to Edmar Martendal Dias de Souza for the support. This study was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (AUXPE-PRO-AMAZONIA-3312/2013/process no. 23038.010315/2013-66).

3.6 REFERENCES

- Adams RP (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 5th Ed. online. <http://juniperus.org/uploads/2/2/6/3/22639912/bk4frontisbnpreface-contents5thedonline2017.pdf>
- Albuquerque MLS, Guedes I, Alcantara JrP, Moreira SGC (2003). Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. *Vibrational Spectroscopy*. 33(1-2): 127–13.
- Alves EG, Vinholis AH, Casemiro LA, Jacometti NA, Furtado C, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG (2008). Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova*. 31(5) 1224-1229.
- Avorn J, Solomon DH (2000). Cultural and economic factors that (mis)shape antibiotic use: the nonpharmacologic basis of therapeutics. *Ann Intern Med*, [S.I.]. 133(2): 128-135.
- Barbosa R I, Lima AD, Mourão Júnior M (2010). Biometria de frutos do buriti *Mauritia flexuosa* L. f. – Arecaceae: Produção de polpa e óleo em uma área de savana em Roraima. *Amazônia: Ciência e Desenvolvimento*. 5(10): 71-85.
- Barros EML, Lira SRS, Lemos SAI, Barros TL, Rizo MS (2014). Study of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) cream in the healing process. *ConScientiae Saúde*. 13(4):603-610.
- Bastos J F A, Moreira IJA, Ribeiro T P (2010). Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 106(4): 331–337.
- Batista JSA, Olinda RG, Medeiros VB, Rodrigues CMF, Oliveira AF, Paiva ES, Freitas CI, Medeiros AC (2012). Antibacterial and healing activities of buriti oil *Mauritia flexuosa* L. *Cienc, Rural*. 42(1): 136 – 141.

Benfatti CS, Cordova SM, Guedes A, Magina MDA, Cordova CMM (2010). Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp. *Rev Pan-Amaz Saude*. 1(2): 33-39.

Caetano N, Saraiva A, Pereira R, Carvalho D, Pimentel MCB, Maia MBS (2002). Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. *Rev Bras Farmacogn. supl* 12: 132 -135.

Carvalho CO, Scudeller VV, Júnior ES, Fernandes OCC, Bolson MA (2011). Características físico-químicas e avaliação do rendimento do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.F. - *Arecaceae*) usando três métodos de extração. in: *BioTupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central*. 3: 123 –134.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Approved Standards – Eighth Edition. CLSI document M11-A8. Wayne, Pa, CLSI 32(5).

Darnet SH, Silva LHM, Rodrigues AMC, Lins RT (2011). Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the amazon region. *Cien. Technol. Alimentos* (printed). 31: 488-491.

Dixon RA (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411: 843 – 847.

Forero-Doria O, Gallego J, Valdes O, Pinzon-Topal C, Santos LS, Guzmán L (2016) Relationship between oxidative stability and antioxidant activity of oil extracted from the peel of *Mauritia flexuosa* fruits. *J Therm Anal Calorim*. 123(3): 2173–2178.

Fuentes E, Rodríguez-Pérez W, Guzmán L, Alarcón M, Navarrete S, Forero-Doria O, Palomo I (2013). *Mauritia flexuosa* Presents In Vitro and In Vivo Antiplatelet and Antithrombotic Activities. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013:1 - 11.

- Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral Biology*. 56: 23-28.
- Koolen HHF, Silva FMA, Gozzo FC, Souza AQL, Souza ADL (2013). Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*. 51: 467–473.
- Lima MRF, Ximenes ECP, Luna JS, Sat’ana AEG (2006). The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev. bras. farmacogn*. 16(3): 300-306.
- Lucarini S, Fagioli L, Campana R, Cole H, Duranti A, Baffone W, Villasaliu D, Casettari L (2016). Unsaturated fatty acids lactose esters: cytotoxicity, permeability enhancement and antimicrobial activity. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 107: 88–96.
- Manhães LRT, Sabaa-Srur AUO (2011). Centesimal composition and bioactive compounds in fruits of buriti collected in Para. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (printed), vol. 31, no. 4, pp. 856-863, 201.
- Meher LC, Sagar DV, Naik SN (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 10(3): 248–268.
- Mekonnen A, Yitayew B, Tesema A, Taddese S (2016). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus*. *International Journal of Microbiology*. 2016(1): 1-8.
- Melhorança Filho AL, Pereira MRR (2012). Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. *Biosci. J*. 28(4): 598-603.
- Milanez JT, Neves LC, Colomb RC, Shahab M, Roberto SR (2018). Bioactive compounds and antioxidant activity of buriti fruits, during the postharvest, harvested at different ripening stages. *Scientia Horticulturae*. 227: 10-21.

Miranda-Arámbula M, Olvera-Alvarado M, Lobo-Sánchez M, Xochipa IP, Ríos-Cortés AM, Cabrera-Hilerio SL (2017). Antibacterial activity of extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Med. Plants Res. 11(25): 414-418.

Ogidi OC, Oyetayo VO, Akinyele BJ (2015). In Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Extracts Obtained from Raw and Fermented Wild Macrofungus, *Lenzites quercina*. International Journal of Microbiology. 2015(5): 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/106308>.

Ostrosky EO, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TL, Nishikawa SO, Freitas BR (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Braz. J. Pharmacogn. 18(2): 301-307.

Pelissari GP, Pietro RCLR, Moreira RRD (2010). Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. Braz. J. Pharmacogn. 20(1): 70-74.

Ribeiro EMG, Baptistel AC, Lins Neto EMF, Monteiro JM (2014). Conhecimento etnobotânico sobre o buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) em comunidades rurais do município de Currais, Sul do Piauí, Brasil. Gaia Scientia. Ed. esp: Populações tradicionais. (2014):28-35.

Silva MJD, Endo LH, Dias ALT, Silva GA, Santos MH, Silva MA (2012). Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). Rev Ciên Farm Básica Apl. 33(2) 267-274.

Silveira CS, Pessanha MCS, Neves Junior I, Menezes FS, Kaplan MA (2005). Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinífera*. Braz. J. Pharmacogn. 15(2): 143-148.

Soares NR, Carvalho, VS, Ferreira SM, Damiani C, Ferreira PP (2017). Evaluation of antimicrobial activity of base oil baru, buriti and pequi liquid soap. Higiene Alimentar. 31: 2461-2465.

Storti EF (1993). Floral Biology of *Mauritia flexuosa* Lin. Fil. In Manaus, AM, Brazil. Acta Amazonica. 23(4): 371-381.

Valgas C, Souza SM, Smânia EFA, Smânia JrA (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Braz J Microbiol. 38: 369–380.

Vázquez-León LA, Páramo-Calderón DE, Robles-Olvera VJ, Valdés-Rodríguez AO, Pérez-Vázquez A, García-Alvarado MA, Rodríguez-Jimenes GC (2017). Variation in bioactive compounds and antiradical activity of *Moringa oleifera* leaves: influence of climatic factors, tree age, and soil parameters. Eur Food Res Technol. 243:1593–1608.

4. Artigo III – Extração, Caracterização Química e Estudo das Atividades Antibacterianas do Extrato Etanólico dos frutos e Inflorescências da Palmeira Macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd ex Mart

Adriana Idalina Torcato de OLIVEIRA*¹; Raimundo Ferreira COSTA²; Juliana Fonseca Moreira da SILVA², Raphael Sanzio PIMENTA¹, Talal Suleiman MAHMOUD³, Guilherme Nobre L. do NASCIMENTO⁴, and Paula Benevides de MORAIS¹.

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO), Universidade Federal do Tocantins, 77001-923 Palmas, TO, Brazil.

²Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA), Universidade Federal do Tocantins, 77001-923 Palmas, TO, Brazil.

³ Centro de Estudos do Mar (CEM), Universidade Federal do Paraná, 83255-976, Pontal do Paraná, PR, Brazil.

⁴Laboratório de Ciências Básica e da Saúde, Universidade Federal do Tocantins, 77001-923 Palmas, TO, Brazil.

RESUMO

Neste trabalho foi realizado a extração com solvente etanol, em inflorescências e polpa de frutos de *Acrocomia aculeata* para caracterização química dos compostos presentes e análise do potencial antibacteriano frente a patógenos humanos. Os extratos das inflorescências (EFM) e da polpa (EPM) informaram a presença de ácidos graxos saturados e insaturados em sua composição química através da análise por cromatografia gasosa (GC-MS). Os testes antimicrobianos foram realizados pelos métodos de difusão em poço e microdiluição. De acordo com o método de difusão em poço somente o EFM apresentou halo de inibição frente as bactérias *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* na concentração de 100 mg mL⁻¹. A concentração inibitória mínima (MIC) apresentou inibição considerada moderada para *S. aureus* (1.56 mg mL⁻¹) e fraca para *E. coli* (3.13 mg mL⁻¹). Os resultados indicaram que o extrato etanólico

obtido das flores da *A. aculeata* apresenta atividade antibacteriana frente as cepas testadas provavelmente devido à presença dos ácidos graxos apresentando-se como potencial produto para fins farmacêuticos.

Palavras-chave: Palmeiras, atividades biológicas, microdiluição, compostos químicos, patógenos humanos.

ABSTRACT

In this research, the ethanolic extraction of chemicals from inflorescences and fruit pulp of *Acrocomia aculeate* was performed, in order to obtain the chemical characterization of their compounds and analyze their antibacterial potential against human pathogens. The presence of saturated and unsaturated fatty acids was reported in the chemical composition of inflorescence (EFM) and pulp (EPM) extracts detected by gas chromatographic analysis (GC-MS). The antimicrobial tests were carried out by the well diffusion and the microdilution methods. According to the well diffusion method, only the EFM extract displayed inhibition halo against the following bacteria: *E. faecalis*, *S. aureus* and *E. coli*, in concentration of 100 mg mL⁻¹. The minimum inhibitory concentration (MIC) has shown moderate (1.56 mg mL⁻¹) inhibition for *S. aureus* and weak (3.13 mg mL⁻¹) inhibition for *E. coli*. The results indicate that the ethanolic extract obtained from the flowers of *A. aculeata* presents antibacterial activity against the strains tested, probably due to the presence of fatty acids, which highlights itself as a potential product for pharmaceutical purposes.

Keywords: *Palm trees, biological activities, microdilution, chemical compounds, human pathogens.*

4.1 INTRODUÇÃO

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. pertence à família Arecacea sendo de ampla distribuição no território brasileiro. Essa palmeira é conhecida popularmente como: bocaiuva, bacaiuveira, bacaúva, macaúba, coco-babão, coco-de-catarro, imbocaia, macaíba (Almeida et al., 2012). Possui alto potencial para utilização na indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos e para produção de biocombustíveis. Devido a utilização indiscriminada de antibióticos pela população, aumentou a procura de compostos provenientes de plantas para produção de novas drogas (Caetano et al., 2002), sobretudo nativas de grandes biomas nacionais, como a Amazônia e o Cerrado. A palmeira *A. aculeata* pode ser aproveitada desde o caule até as folhas e frutos. O fruto tem formato esférico, casca lisa e coloração variando de marrom a amarelada quando maduro. A polpa é amarela e aderida ao endocarpo que envolve a amêndoa. Dentre os usos mais comuns desta palmeira estão o uso dos frutos para produção de farinhas e óleos, biomassa, carvão ativado e de suas folhas na nutrição animal. O processo de aproveitamento do fruto da macaúba é feito de forma artesanal e vem sendo explorado de forma extrativista (Souza et al., 2006). Em relação às características químicas, reporta-se a influência das condições climáticas, do estágio de maturação, do local de plantio e da época da colheita na sua expressão (Pedron et al., 2004). Os objetivos deste artigo são o estudo dos compostos presentes nos extratos etanólicos obtidos a partir da amêndoa, polpa e inflorescência dessa palmeira através de análise por cromatografia gasosa (GC-MS) e a realização de testes de atividades antimicrobianas frente a bactérias patogênicas.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes Utilizados. Álcool etílico (C_2H_6O), cloreto de alumínio ($AlCl_3$), cloreto de sódio ($NaCl$), dimetilsulfóxido (DMSO) são da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os meios de cultura Mueller Hinton caldo e ágar são da marca Kasvi (Curitiba, Paraná, Brazil). A água utilizada nas análises foi destilada e a ultrapura produzida no aparelho Milli-Q Millipore (Bedford, USA). Os outros reagentes utilizados neste estudo e na triagem fitoquímica eram próprios para análise (P.A.) ou com grau analítico e/ou cromatográfico.

4.2.2 Preparação das Amostras. As inflorescências e os frutos maduros de *A. aculeata* foram coletadas (Figura 1a, b e c) no campus da Universidade Federal do Tocantins – UFT em Araguaína ($7^{\circ}06'46,8''S48^{\circ}11'34,6''W$). O número de registro 10.954 foi obtido após confecção de exsicata da espécie *Acrocomia aculeata* fornecido pelo Herbário HTO da UFT.



Figura 1: Palmeira adulta de *A. aculeata* em seu habitat (a), espata com inflorescência (b) e frutos maduros coletados (c). Fotos de arquivo pessoal.

Para obtenção do extrato etanólico foram separadas as partes dos frutos com auxílio de faca de aço inox esterilizada em pedaços menores e separadas as partes (Figura 2a). As amostras

selecionadas: amêndoas e polpa foram secas em estufa com circulação de ar (Fanem, São Paulo, Brazil) a temperatura de 40-45 °C por 48 h (Figura 2b). O mesmo procedimento de secagem foi realizado com as flores (Figura 3a). Após esfriar, o material foi triturado em processador doméstico (Arno, São Paulo, Brazil) e as amostras guardadas em sacos estéreis sob refrigeração (12-16 °C).

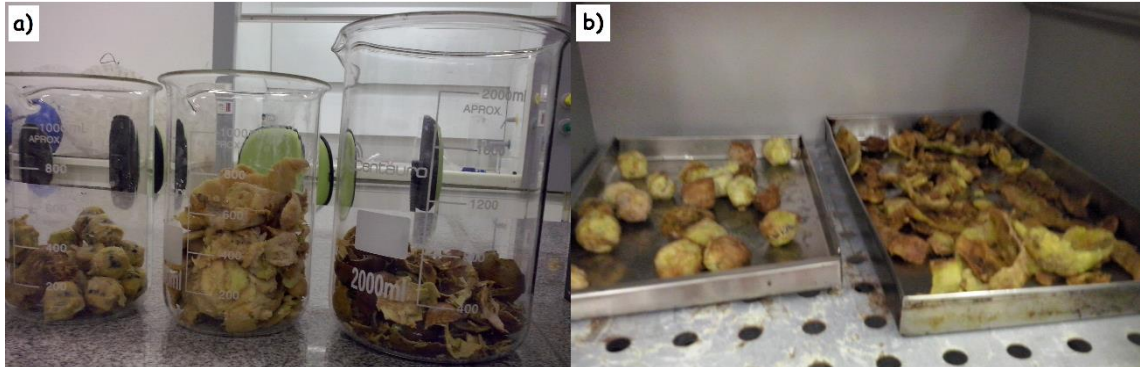


Figura 2: Preparação dos frutos. (a) Separação da amêndoa, polpa e casca, (b) secagem de amêndoas e polpa em estufa a 40 - 45 °C. Fotos de arquivo pessoal.

Para a extração por solvente com aparelho Soxhlet, foram pesadas cerca de 10 a 20 gramas das amostras em balança analítica de precisão (Shimadzu do Brazil, São Paulo, Brazil) e colocadas em dois cartuchos de celulose com 250 mL de álcool etílico (98 °GL) para extração simultânea com dois extratores por um período de cinco horas (Figura 3b). Após o término do processo o solvente foi removido por evaporação em rotaevaporador (Cienlab, São Paulo, Brazil) a pressão reduzida e temperatura de 50°C.

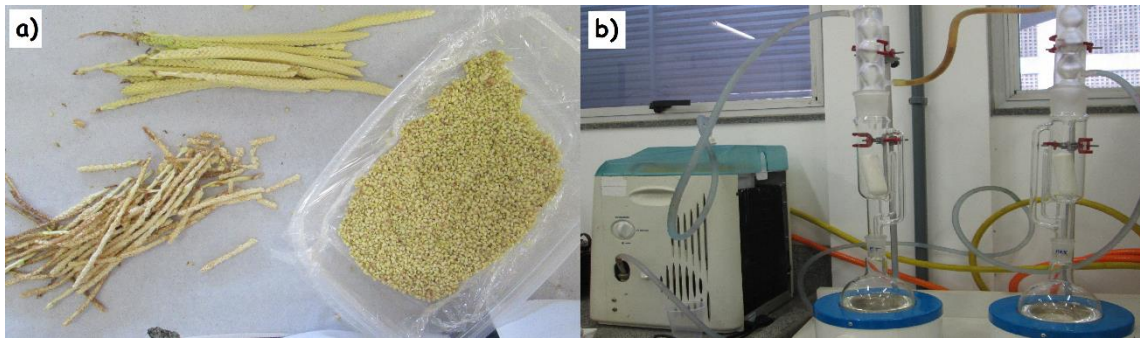


Figura 3: Preparação de amostras. Flores unissexuais de ambos os sexos retiradas da inflorescência (a), extração com solvente etanol e aparelho Soxhlet (b). Fotos de arquivo pessoal.

4.2.3 GC –MS. Para análise dos compostos químicos presentes nos extratos vegetais estes foram derivatizados (reação de esterificação) através de catálise ácida de trifluoreto de boro em metanol (Meher et al., 2006 adaptado). As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC / MS QP Modelo 2010 Ultra equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). O programa de temperatura para os alcanos saturados foi (C₁₁ - C₄₀) 50 °C (0 min); 5 °C min⁻¹ até 310 °C (20 min), onde o tempo de retenção do C₁₁H₂₄ é 10.020 min e do C₁₃H₂₈ é 15.535 min no modo Split: 1:10. A rampa de aquecimento foi programada para a faixa de temperatura 50 °C (0 min); 5°C min⁻¹ até 300 °C (10 min) a velocidade de 3 °C min⁻¹. Temperatura injeção: 300 °C; temperatura interface: 250 °C no modo Split: 1:25. O gás Hélio foi utilizado como gás de transporte a velocidade de 1.2 mL.min⁻¹. A energia do elétron foi de 70 eV e a temperatura da fonte de íons de 250 °C. Os compostos foram identificados por comparação do espectro de massa e os seus dados de retenção GC com os padrões e por comparação dos espectros de massa com os das bibliotecas NIST-08 (National Institute of Standards and Technology) e citados na literatura (Adams, 2007).

4.2.4 Atividade Antibacteriana. Para realização dos testes de atividade antibacterianas dos extratos etanólicos foram utilizadas cepas de referência ATCC (American Type Collection Culture) de bactérias patogênicas humanas obtidos da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz (INQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brazil). Foram usados para os testes as bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC-4083) e Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC-25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853).

Teste de difusão em poço. Os ensaios foram realizados em triplicata, através do método de difusão por poço (CLSI, 2009) em placas de petri contendo 50 mL de meio ágar Muller Hinton (AMH). As soluções dos inóculos foram preparados utilizando-se de três a quatro colônias da cepa isolada em placas e diluindo em solução salina a 0.85 % até atingirem a turbidez correspondente a 0.5 da escala de MacFarland (Figura 4a) obtendo-se cerca de $1,5 \cdot 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC mL^{-1}) (Groppo et al., 2002). Como controle negativo foi utilizado a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % e para controle positivo cloranfenicol ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). As soluções contendo os inóculos foram semeadas na superfície das placas contendo meio de cultura e em seguida os poços foram perfurados com canudo de plástico estéril de 5 mm de diâmetro (Figura 4b). Esses poços foram preenchidos com 50 μL de cada extrato diluído em DMSO 10 % na concentração de 100 mg mL^{-1} e com os controles positivo e negativo (Figura 4c). Após 24 h de incubação à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, com auxílio de paquímetro digital.



Figura 4: Teste de difusão em poço. (a) Comparação com escala Mc Farland, (b) perfuração dos poços e (c) adição de solução de extrato. Fotos de arquivo pessoal.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada utilizando a técnica de microdiluição descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Os testes foram realizados em placa “Sensitive microtiter” de 96 poços esterilizada. Adicionou-se inicialmente em cada poço 100 μL de meio de cultura caldo Muller Hinton em seguida adicionou-se os extratos realizando diluição seriada de acordo com Benfati et al. (2010), obtendo-se assim concentrações de extrato de planta (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.785 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Como controle positivo foi utilizado cloranfenicol na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a diluição seriada forneceu as concentrações de 500, 250; 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 $\mu\text{L mL}^{-1}$; e como controle negativo foi utilizado solução de DMSO 10%. Foram adicionados aos poços 5 μL da solução do inóculo contendo cerca de 10^7 células, com exceção da coluna com controle do meio, onde não se adicionou micro-organismo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, adicionou-se em cada orifício das placas 30 μL de solução aquosa de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) a 0.03 %. Realizou-se a leitura das placas até 4h após a adição do corante onde a cor azul significou inibição e rosa a não inibição do crescimento.

4.3. RESULTADOS

4.3.1 GC – MS. Os valores obtidos por cromatografia em fase gasosa para a composição química dos principais compostos encontrados nos extratos etanólicos de *A. aculeata* após reação de esterificação são apresentados na Tabela 1. Observou-se que os extratos etanólicos obtidos da amêndoa (EAM) continham 81.66 % ácidos graxos saturados e 14.36 % de ácido

insaturado. Entre os ácidos graxos saturados a maior proporção foi de ácido mirístico (63.79 %) enquanto o ácido graxo insaturado identificado com 14.36 % foi o ácido oleico. No extrato etanólico da polpa (EPM) a maior proporção de ácido graxo foi do ácido palmítico (48.54 %) que é um ácido saturado seguido do ácido oleico (43.70 %) que é um ácido insaturado. No extrato etanólico das flores foram encontrados ácidos graxos: palmítico (saturado, 33.07 %) e oleico (insaturado, 28.84 %).

Tabela 1: Ácidos graxos detectados (Área, %) e tempo de retenção (RT) dos extratos etanólicos da amêndoa, polpa e flores de *A. aculeata* por análise GC-MS.

Compostos	EAM		EPM		EFM	
	RT (min)	Area %	RT (min)	Area %	RT (min)	Area %
Ácido Caprílico	7.159	7.60	nd	nd	nd	nd
Ácido Cáprico	10.158	3.74	nd	nd	nd	nd
Ácido Mirístico	12.930	63.79	nd	nd	25.411	1.27
Ácido Palmítico	19.867	6.53	19.970	48.54	19.939	33.07
Ácido Oleico	24.665	14.36	24.718	43.70	24.667	28.84
Ácido Láurico	nd	nd	29.171	1.31	nd	nd
AGS		81.66		49.85		34.34
AGI		14.36		47,70		28.84

AGS: ácidos graxos saturados, AGI: ácidos graxos insaturados. RT: tempo de retenção em minutos, Área: pico proporcional, nd: não detectado.

4.3.2 Atividade Antibacteriana

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado com os extratos etanólicos EAM, EPM e EFM (Tabela 2). Os extratos EPM e EAM não apresentaram halo de inibição frente às bactérias testadas. O extrato das flores da Macaúba (EFM) apresentou halo de inibição para as bactérias: *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis* na concentração de 100 mg mL⁻¹.

Tabela 2. Média das triplicatas do diâmetro do halo de inibição em milímetros (mm) da susceptibilidade antimicrobiana dos extratos etanólicos EAM, EPM e EFM na concentração de 100 mg mL⁻¹.

Microorganismo	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	EAM	EPM	EFM
<i>E. faecalis</i>	-	-	11.25
<i>E. coli</i>	-	-	14.71
<i>S. aureus</i>	-	-	13.18
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-

Concentração Inibitória Mínima (MIC). A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada com os extratos EAM, EPM e EFM (Tabela 3). O extrato das flores apresentou concentração inibitória mínima somente para as bactérias: *E. coli* na concentração de 3.12 mg mL⁻¹ e para *S. aureus* na concentração de 1.56 mg mL⁻¹.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg mL⁻¹ de extratos etanólicos da amêndoa (EAM), da polpa (EPM) e das flores (EFM) de *A. aculeata* com atividades antibacterianas.

Extrato etanólico	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EAM				

EPM		
EFM	3.13	1.56

4.4 DISCUSSÃO

Para obtenção dos extratos etanólicos obtidos a partir de diversas partes da palmeira Macaúba foi utilizado o sistema Soxhlet visto que se trata de um método padrão em que a temperatura e a natureza do solvente favorecem a eficiência na obtenção de compostos bioativos. Foi escolhido como solvente o álcool etílico devido principalmente à sua baixa toxicidade diante dos solventes orgânicos comumente utilizados além do fato de ter preço acessível, vir de uma fonte renovável e ser capaz de extrair uma ampla gama de compostos polares e alguns compostos não-polares (Bastos et al., 2010).

Comparando com as concentrações de ácidos graxos obtidas através das análises de GC-MS da amêndoa com solvente hexano por Amaral et al. (2011) o extrato etanólico EAM apresentou maior concentração de ácidos graxos saturados, 81.66 % em comparação com os 71.05% encontrados por aquele autor. Enquanto a concentração de ácidos graxos insaturadas foi menor, 14.36 % em relação à literatura mencionada que foi de 28.95 %. O extrato de polpa da *A. aculeata* é o mais estudado e melhor descrito na literatura tendo sua extração obtida por diversos solventes. O extrato etanólico da polpa (EPM) apresentou uma maior quantidade de ácidos graxos saturados, 49.85 % comparado aos obtidos com extração utilizando o solvente hexano (16.87% por Amaral et al. (2011) e 29.687% obtido por Trentine et al. (2016)) e também quando comparado em relação aos extratos obtidos usando como solventes o acetato de etila (30.212 %) e o isopropanol (30.157 %). A concentração de ácidos graxos insaturados obtidos foi menor (47.70 %) do que os encontrados para o extrato hexânico (79.67 % por Amaral et al. (2011) e 70.314% por Trentine et al. (2016)). O mesmo fato ocorreu para os extratos obtidos com os

solventes acetato de etila (68.789 %) e isopropanol (68.989 %) (Trentine et al., 2016). O EFM apresentou em sua composição 34.34 % de ácidos graxos saturados e 28.84 % de insaturados. Embora não exista na literatura nenhum trabalho referente a composição química do extrato etanólico de flores de macaúba, observa-se que este extrato apresenta composição parecida com o EPM. Todos os extratos demonstraram maior concentração de ácidos graxos saturados, que são substâncias químicas responsáveis pelo sabor, palatabilidade e conservação em produtos alimentícios (Oliveira et al., 2016). As diferenças na concentração dos grupos químicos encontradas em comparação com a literatura podem se dever a vários fatores. Além da polaridade outros fatores podem afetar a eficiência de extração como: as diferentes interações entre soluto e solvente (Almeida et al., 2012), às variabilidades fenotípicas (Ciconini et al., 2013) e outros aspectos como tipo de solo, umidade e clima que podem se manifestar na planta por meio de processos fisiológicos, provocando variações nos compostos produzidos pelos vegetais. Por exemplo, Milanez et al. (2018) discutiram que as frutas de buriti colhidas em diferentes estádios de amadurecimento produziram diferentes quantidades de compostos.

De acordo com os testes de atividade antimicrobiana somente o EFM demonstrou atividade antibacteriana (halo de inibição) pelo método de difusão em poço tanto em frente as cepas Gram-positivas: *E. faecalis* (11.25 mm) e *S. aureus* (13.18 mm) quanto a Gram-negativa *E. coli* que apresentou o maior halo de inibição (14.71 mm), sugerindo atividade inibitória de amplo espectro. No método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima os extratos EAM e EPM não apresentaram inibição frente as bactérias testadas e o EFM confirmou a inibição para as bactérias *S. aureus* (3.13 mg mL⁻¹) e *E. coli* (1.56 mg mL⁻¹). De acordo com Ribeiro (2008), não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para extratos obtidos de plantas, quando comparados aos antibióticos padrões. As zonas de inibição formadas pelos extratos possuem particularidades apresentando variáveis (técnica usada, o meio de crescimento, o micro-organismo teste) que devem ser levadas em consideração (Duarte et al., 2005; Nostro et al., 2004; Saeed; Sabir, 2004; Christophe et al., 2000). Se levarmos em

consideração a proposta de Aligianis et al. (2001) para classificação de materiais vegetais com base nos resultados de MIC onde são consideradas: forte inibição extratos com a CIM até 0.5 mg mL⁻¹; inibição moderada CIM entre 0.6 e 1.5 mg mL⁻¹ e fraca inibição CIM acima de 1.6 mg mL⁻¹ o EFM seria considerado de inibição moderada para *S. aureus* e fraca inibição para *E. coli*. Os ácidos graxos podem ser os responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada pelos extratos desse estudo (Hashem; Saleh, 1999; Nazif, 2002). Algumas pesquisas sugerem que ácidos graxos saturados de cadeia média e os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como o ácido oleico são responsáveis por atividades antimicrobianas do leite humano e bovino, inativando tanto bactérias Gram positivas quanto Gram negativas (Isaacs et al., 1990; Isaacs et al., 1995). O mecanismo de ação desses compostos não foi definido, no entanto sugere-se que estes ácidos afetam a parede celular interferindo com mecanismos de bacteriemia tais como a prevenção da formação de biofilme e de inibição da produção de toxinas e enzimas (Ogidi et al., 2015).

4.5 CONCLUSÃO

Apesar dos extratos do fruto EAM e EPM não apresentaram atividades antibacterianas frente aos micro-organismos estudados a sua composição química identificou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados que sugerem a sua utilização no enriquecimento da dieta, fonte de bioativos e agregação de valor aos produtos e subprodutos in natura ou processados no ramo alimentício. O extrato etanólico obtido a partir das flores da *A. aculeata* mostrou potencial para obtenção de antibacterianos ativos contra cepas Gram positivas e Gram negativas. A presença dos ácidos graxos saturados e insaturados sugerem que estes podem contribuir para as atividades antimicrobianas observadas.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir conflitos de interesses em relação a publicação desse artigo.

4.6 REFERÊNCIAS

- Adams RP (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 4^a. ed. Carol Stream.
- Aligianis N, Kalpoutzais E, Mitaku S, Chinou J B (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 49: 4168-4170.
- Almeida PP, Mezzomo N, Ferreira SRS (2012). Extraction of *Mentha spicata* L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. Food Bioproc. Technol. 5: 548–559.
- Amaral FP, Broetto F, Batistella CB, Jorge SMA (2011). Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq) lodd. ex mart] coletada na região de Botucatu, SP. Rev. Energ. Agric. 26: 12-20.
- Bastos JFA, Moreira IJA, Ribeiro TP (2010). Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol in rats. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 106(4): 331–337.
- Benfatti CS, Cordova S M, Guedes A, Magina MDA, Cordova (2010). Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp. Rev Pan-Amaz Saude, 1(2): 33-39.
- Caetano N, Saraiva A, Pereira R, Carvalho D, Pimentel MCB, Maia MBS (2002). Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. Rev Bras Farmacogn. 12 (supl.): 132 -135.
- Christoph F, Kaulfers P-M, Stahl-Biskup E (2000). A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of β - triketones. Planta Med. 66: 556-560.

Ciconini G, Favaro SP, Roscoe R, Miranda CHB, Tapeti CF, Miyahira MAM, Bearari L, Galvani F, Borsato AV, Colnago LA, Naka MH (2013). Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ind. Crops Prod.* 45: 208-214.

CLSI. Manual Clinical and laboratory Standards Institute/NCCLS (2009). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standards M11-A8. Wayne, Pa.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6 th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Duarte MCT, Figueira, GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C (2005). Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 97: 305-311.

Grosso FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A (2002). Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J*, 52: 433-437.

Hashem FA, Saleh MM (1999). Antimicrobial components of some Cruciferae plants (*Diplotaxis harra* Foresk and *Erucaria microcarpa* Bioss). *Phytother Res* 13: 329–332.

Henderson A, Galeano G, Bernal R (1995). Field guide to the palms of the Americas. Princeton NJ: Princeton University Press.

Isaacs CE, Kashyap S, Heird WC, Thormar H (1990). Antiviral and antibacterial lipids in human milk and infant formula feeds. *Arch Dis Child* 65: 861-864.

Isaacs CE, Litov RE, Thormar H (1995). Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *J Nutr Biochem* 6: 362-366.

Meher LC, Sagar DV, Naik SN (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3): 248- 28.

Milanez JT, Neves LC, Colomb RC, Shahab M, Roberto SR (2018). Bioactive compounds and antioxidant activity of buriti fruits, during the postharvest, harvested at different ripening stages. *Scientia Horticulturae*. 227: 10–21.

Motta PEF, Curi N, Oliveira-Filho AT, Gomes JBV (2002) Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37: 1023-1031

Nazif NM (2002). Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. fruits and their antimicrobial activity. *Food Chem*. 76: 77–81.

Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Roccaro AS, Alonzo V (2004). Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett*. 230: 191-195.

Ogidi OC, Oyetayo VO, Akinyele BJ (2015). In Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Extracts Obtained from Raw and Fermented Wild Macrofungus, *Lenzites quercina*. *Intern. J. Microb*. 5: 1-7.

Oliveira AIT, Mahmoud TS, Nascimento GNL, da Silva JFM, Pimenta RS, Morais P B (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Palm Leaf Extracts from Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macaúba (*Acrocomia aculeata*). *The Scientific World Journal*. 2016: 5.

Pedron FA, Menezes JP, Menezes NL (2004). Parâmetros biométricos de fruto, endocarpo e semente de butiazeiro. *Ciência Rural*. 34(2): 585-586.

Ribeiro CM (2008). Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará, Belém. 67p

Saeed MA, Sabir AW (2004). Antibacterial activities of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora mukul*. *Fitoterapia*. 75: 204-208.

Souza FC, Gomes D, Ferraz A, Inamasu RY (2006). Caracterização física e mecânica do fruto da macaúba. In XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - João Pessoa - PB.

Trentini CP, Oliveira DM, Zanette CM, Silva C (2016). Low-pressure solvent extraction of oil from macauba (*Acrocomia aculeata*) pulp: characterization of oil and defatted meal. *Ciência Rural*. 46 (4): 725-731.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos etanólicos das folhas das palmeiras não inibiram o crescimento dos microorganismos testados segundo o método de difusão em disco. No entanto a caracterização química por fitoquímica e análise por cromatografia indicaram a existência de grupos e compostos químicos de importância econômica sugerindo uso potencial para a confecção de novos produtos.

A análise química dos extratos etanólicos obtidos da polpa e da casca dos frutos de *M. flexuosa* evidenciaram a presença de ácidos graxos saturados e insaturados além de apresentarem inibição frente as bactérias Gram positivas e Gram negativas. O extrato obtido a partir da casca apresentou inibição pelo teste de difusão em poço e no do teste de microdiluição demonstrando poder ser utilizado como agente antimicrobiano.

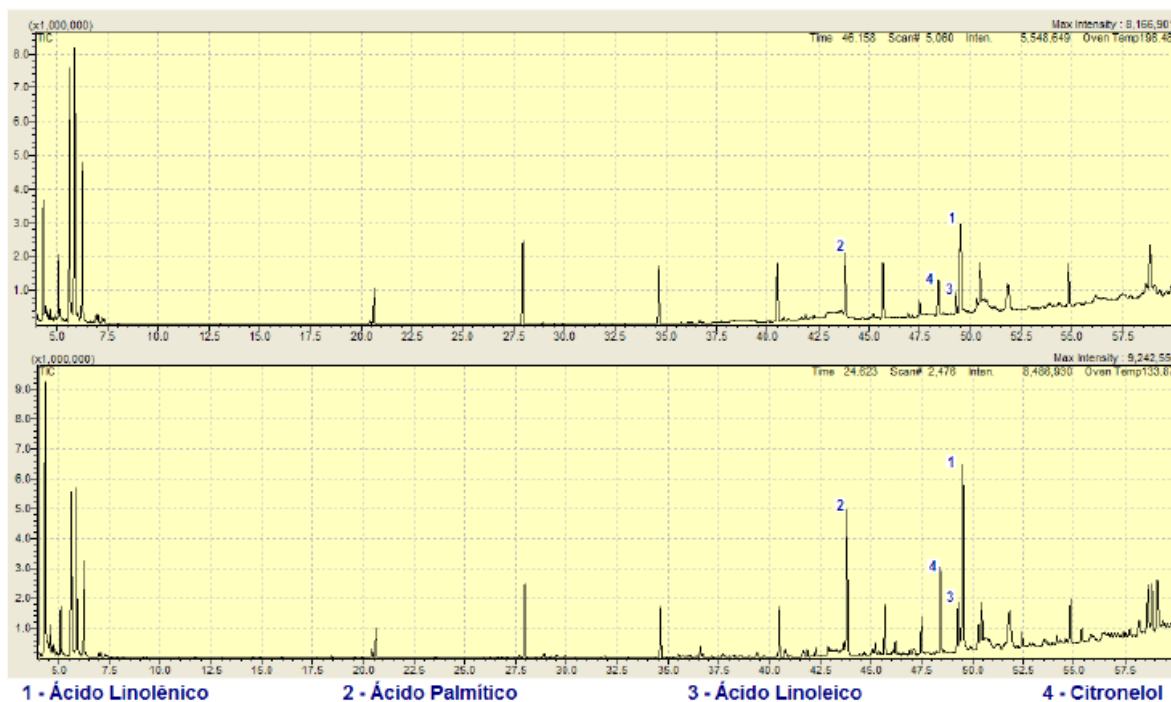
O estudo dos compostos químicos presentes dos extratos etanólicos obtidos dos frutos e da inflorescência da *A. aculeata* indicaram a presença de ácidos graxos insaturados e saturados. Somente o extrato etanólico das flores apresentou inibição frente a algumas bactérias Gram positivas e Gram negativas testadas indicando o possível uso como agente antibacteriano.

A pesquisa se mostrou muito relevante no estudo das espécies: *A. speciosa*, *M. flexuosa* e *A. aculeata* presentes no estado do Tocantins com o levantamento do seu potencial na formulação de novos produtos.

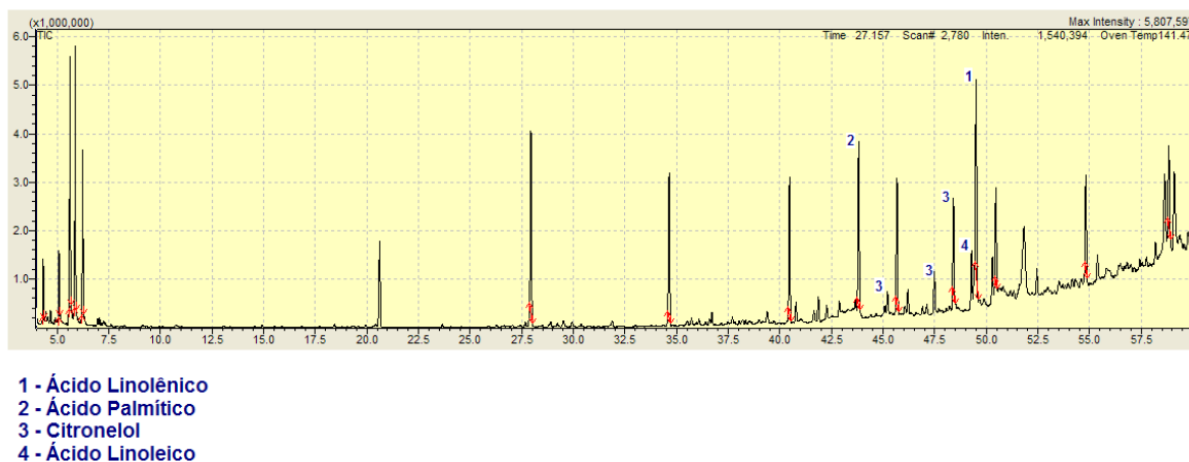
6. ANEXOS

Cromatogramas GC/MS dos extratos das amostras obtidos após derivatização com $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ em coluna HP-5ms, Arquivo Pessoal.

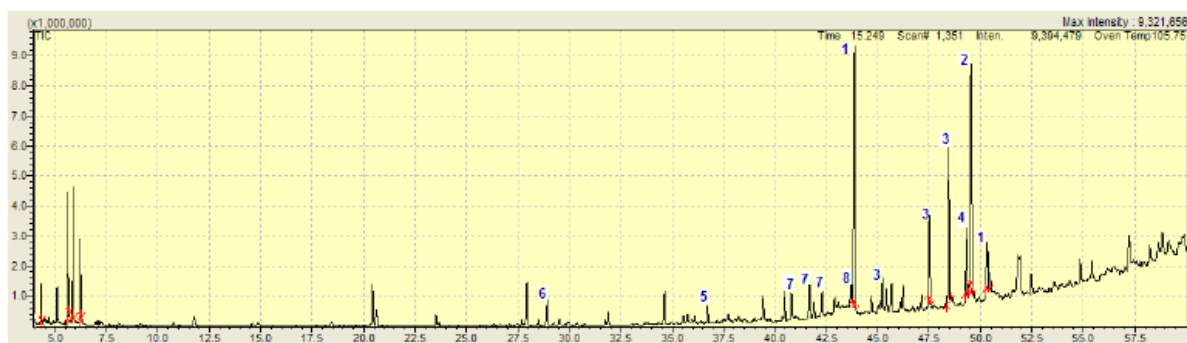
EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO POR SOXLHET DE FOLHA DE BABAÇU SEM E COM FILTRAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO



EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO POR SOXLHET DE FOLHA DE MACAÚBA



EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO POR SOXLHET DE FOLHAS DE BURITI



1 - Ácido Palmítico
2 - Ácido Linolênico
3 - Citronelol

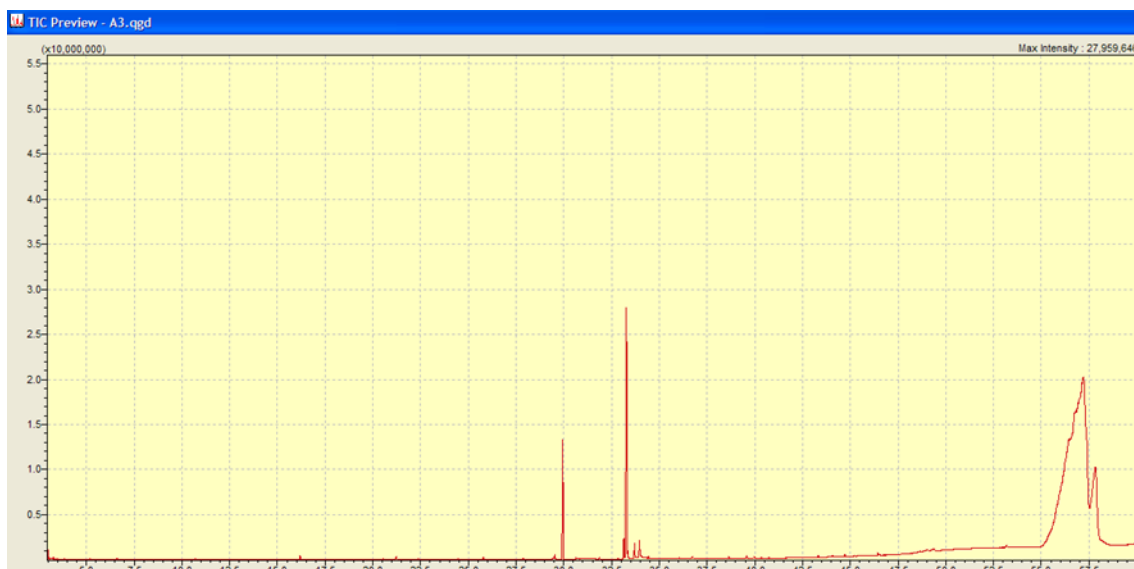
4 - Ácido Linoleico
5 - Ácido Mirístico
6 - Ácido Láurico

7 - Phytol
8 - Ácido Oleico

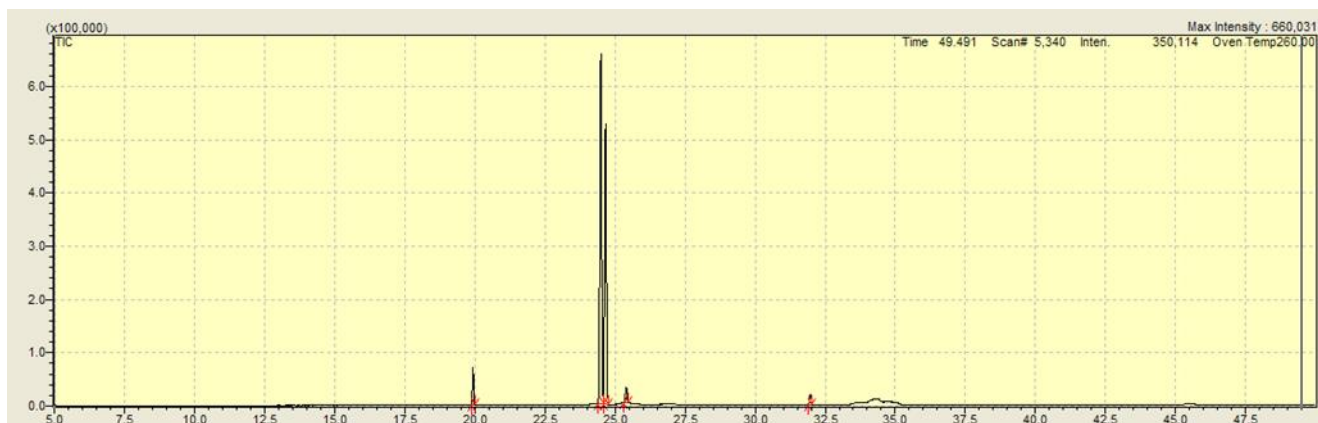
Extrato Etanólico de Polpa de Buriti



Extrato Etanólico de Casca de Buriti



Extrato etanólico da Amêndoa de Macaúba



Extrato da Polpa de Macaúba



Extrato de Flor de Macaúba

