

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO BRUTO HIDROALCÓOLICO DE *Euterpe oleracea* MART E COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

SALES JUNIOR, José Helvecio¹
ROCHA, Claudia Quintino²
FIGUEIREDO, Patrícia de Maria da Silva³

RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), é uma palmeira da família Arecaceae que ocorre nas Américas Central e do Sul. O açaí é composto por polifenóis, cujos principais são as antocianinas e proantocianidinas, descritas na literatura como metabólitos com atividade antimicrobiana. O objetivo do trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana do extrato das folhas de açaí frente a espécies de fungos e bactérias bem como outras atividades biológicas como antioxidante, hemolítica e caracterização química estrutural. A atividade antimicrobiana foi avaliada em cepas gram-positivas, negativas e fungos. A ação antioxidante foi testada através da inativação do radical DPPH e a avaliação química estrutural por cromatografia líquida de alta eficiência. O extrato bruto inibiu o crescimento de cepas de importante interesse clínico como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e apresentou-se não irritativo para hemácias (não hemolítico). A atividade antioxidante apresentou-se dose dependente e superior a de antioxidantes padrões. Dessa forma conclui-se que a espécie *Euterpe oleracea* MART é promissora na eliminação de microorganismos patogênicos. Considerando o contexto atual de resistência a diversos antibióticos, o extrato pode gerar novas alternativas terapêuticas para combate a infecções geradas por esses microorganismos.

PALAVRAS-CHAVE: Açaí. *Euterpe oleracea* Mart. Atividade antimicrobiana.

EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE CRUDE HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Euterpe oleracea* MART AND CHEMICAL COMPOSITION BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

ABSTRACT

The açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), is a palm tree of the Arecaceae family that occurs in Central and South America. Açaí is composed of polyphenols, the main ones being anthocyanins and proanthocyanidins, described in the literature as metabolites with antimicrobial activity. The objective of this article was to evaluate the antimicrobial action of the açaí leaf extract against species of fungi and bacteria as well as other biological activities such as antioxidant, hemolytic and structural chemical characterization. Antimicrobial activity was evaluated on gram-positive and gram-negative strains and fungi. The antioxidant action was tested through DPPH radical inactivation and structural chemical evaluation by high performance liquid chromatography. The crude extract inhibited the growth of strains of important clinical interest such as *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and was non-irritating to red blood cells (non-hemolytic). Antioxidant activity was dose dependent and superior to that of standard antioxidants. Thus, it is concluded that the species *Euterpe oleracea* MART is promising in the elimination of pathogenic microorganisms. Considering the current context of resistance to several antibiotics, the extract can generate new therapeutic alternatives to combat infections generated by these microorganisms.

KEYWORDS: Açaí. *Euterpe oleracea* Mart. Antimicrobial activity.

¹ Acadêmico do 7º período do curso de Medicina do Centro Universitário FAG. Farmacêutico e Mestre em Saúde do Adulto pela Universidade Federal do Maranhão. Email: jh.junior@hotmail.com.br

² Docente pHD do Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão. E-mail: claudiarocha3@yahoo.com.br

³ Docente pHD do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão. E-mail: figueiredo.patricia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é o fruto do açaizeiro, uma palmeira típica da Amazônia. Ocorre espontaneamente nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá. Este fruto é considerado um alimento funcional cuja polpa apresenta elevado valor energético por conter alto teor de ômega 6 e 9. Além disso é rico em, fibras, vitamina E, proteínas e minerais como manganês, ferro, zinco e cobre. Apresenta uma grande quantidade de antioxidantes, tais como antocianinas e proantocianidinas que são fitocomponentes predominantes. Desses compostos, as antocianinas são as que mais contribuem para a capacidade antioxidante da polpa do açaí (PORTINHO *et al*, 2012).

As sementes têm sido descritas como apresentando potencial antioxidante e citotóxico em linhas celulares tumorais humanas (BARROS *et al*, 2015). Apresenta ainda benefícios em relação à dislipidemia, diabetes mellitus tipo II e síndrome metabólica, tendo ainda efeito anti-inflamatório, antimicrobiano e anti-proliferativo (FRAGOSO *et al*, 2012; PORTINHO *et al*, 2012; DIAS *et al*, 2014; ESPITIA, *et al*, 2014; GALE *et al*, 2014).

Dentro do contexto microbiológico, a resistência a múltiplos fármacos por microrganismos patogénicos humanos vem crescendo devido, essencialmente, ao uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças infeciosas (KARAMAN *et al*, 2003). O aumento das resistências associadas às doenças infeciosas e à mortalidade está pressionando os sistemas de saúde, principalmente a nível hospitalar (ORSI *et al*, 2002).

Estudos realizados na Europa com microrganismos, como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, revelaram que a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos diminuiu, havendo um aumento global crescente de virulência (CARDOSO *et al*, 2002; NOVAIS *et al*, 2004; MACHADO *et al*, 2007).

A European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2015) referiu que, apesar de a ocorrência de MRSA ter estabilizado ou mesmo diminuído em vários países europeus, alguns países como Portugal apresentam percentagens de MRSA superiores a 25%. Refere ainda que nos últimos quatro anos, tem havido uma tendência crescente significativa da resistência combinada para múltiplos antibióticos em bactérias como *E. coli* e *K. pneumoniae*.

2. METODOLOGIA

2.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Euterpe oleracea* Mart. selecionadas foram coletadas manualmente na área urbana do município de São Luís, Maranhão – Brasil. A coleta foi realizada no mês de Outubro de 2017 entre 6:00 e 7:00 da manhã. Uma amostra da planta foi encaminhada ao Herbário Ático Seabra da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para ser identificada e catalogada sob o número de registro 27892.

2.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO

As folhas foram coletadas e limpas manualmente, foram secas em temperatura ambiente. Posteriormente foram trituradas e pesadas, obtendo-se 122g de material vegetal. Em seguida, este material triturado e pesado foi adicionado a 366 mL da mistura hidroetanolica (70% de etanol 1:4 m/v) deixando macerar em frasco rosqueado, ao abrigo de luz a temperatura ambiente por três dias com renovação do solvente a cada 24horas e agitação ocasional segundo a metodologia proposta por Matos (2009). A solução extrativa foi filtrada a vácuo usando funil de Buchner, o filtrado foi evaporado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada a 40°C. O material concentrado foi levado ao freezer, adequadamente vedado e mantido até ser liofilizado para posterior utilização nos testes. Nos testes onde se aplicou o extrato, o mesmo foi ressuspensido em água estéril na concentração de 100mg/ml.

2.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

O teor de fenóis do extrato foi obtido utilizando 100 µL da solução do EH seco (2mg/mL) etanol, 100µL do reagente Folin-Ciocalteau (Merck®) e 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 20% por duas horas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Concentrações de ácido gálico (Merck®) foram utilizadas como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer®) $\lambda=760$ nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama do EH (SILVA, 2010).

2.4. CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-ESI-IT-MS)

2.4.1. Análises de LC-MS

Para o HPLC-ESI-IT-MS / MS, foi realizada uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes; a solução foi purificada por extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de MeOH: H₂O (1: 1, v / v). Os compostos foram eluídos dos cartuchos utilizando 1 mL de MeOH: H₂O (1: 1, v / v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm e secas. O extrato foi diluído para 10 µg / mL em solvente HPLC. Alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no LC-ESI-IT-MS (ROCHA *et al*, 2014).

A análise foi realizada em um LC-ESI-MS-MS on-line e em um espectrômetro de massa LCQ Fleet, Thermo Scientific®. A coluna analítica utilizada para a separação por LC foi um Kinetex® C18 (2,1 x 100 mm, 100 Å e 5 µm). A análise foi realizada com água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (B) acrescidos de 0,1% de ácido fórmico em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% em 6 minutos a vazão de 0,4. mL / min. A amostra foi infundida no espectrômetro de massa do sistema de HPLC, onde a amostra foi analisada on-line pelo ESI-MS em modo negativo e o detector UV associado. Os dados do espectro de massa foram obtidos no mesmo espectrômetro de massa Fleet LCQ da Thermo Scientific ® (ROCHA *et al* 2014).

2.4.2 Análises FIA-ESI-IT-MSn

Para o ensaio de FIA-ESI-IT-MSn a infusão de fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador de armadilha iônica linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). EUA). Utilizou-se tubo capilar de aço inoxidável a 280°C, voltagem de 5,00 kV, voltagem capilar de -90 V, lente tubular de -100 V e fluxo de 5 µL min-1. Análise de varredura completa foi registrada na faixa m / z de 100-1000. Fragmentações de múltiplos estágios (ESI-MSn) foram realizadas usando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons naquele intervalo de m / z. O segundo evento de varredura foi uma experiência de MS / MS realizada usando uma varredura dependente de dados nas moléculas [M-H] - dos compostos de interesse em uma energia de colisão

de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons do produto foram então submetidos à fragmentação adicional nas mesmas condições, até que não mais fragmentos foram observados. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV com os dados da literatura (ROCHA *et al*, 2014).

2.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi analisada através do sistema de redução do radical DPPH. A solução estoque foi preparada na concentração de 60 μM em MeOH com absorbância inicial de aproximadamente $0,62 \pm 0,02$ ($\lambda = 517$ nm), a temperatura ambiente. O extrato foi solubilizado em MeOH na concentração inicial de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir dessa concentração foram feitas sucessivas diluições de acordo com a reatividade da amostra. As concentrações variaram de 5 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A mistura reacional na cubeta foi composta pela adição de 1950 μL da solução do radical DPPH em 50 μL da amostra diluída em várias concentrações (SILVA, 2010). No teste com o branco as amostras foram substituídas por metanol. A absorbância foi medida no primeiro minuto da reação ($t = 1$), e monitorada nos primeiros 5, 10 e 20 min. A porcentagem de inibição dos radicais DPPH $^{\bullet}$ (I_{DPPH}) para cada amostra foi calculada de acordo com a equação (equação 1).

Equação 1 – Porcentagem de inibição do radical DPPH

$$I_{\text{DPPH}} \% = [1 - \left(\frac{\text{AbsA}}{\text{AbsB}} \right)] \times 100$$

Onde: AbsA e AbsB são as absorbâncias da amostra e do controle (branco) no término da reação respectivamente.

2.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.6.1. Seleção das cepas bacterianas e fúngicas

As amostras bacterianas e fúngicas são oriundas do Laboratório de Microbiologia Clínica – Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão. Para realização dos testes foram utilizados microrganismos padrão (ATCC - American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922,

Streptococcus pyogenes ATCC 19615 e *Salmonella enteretidis* ATCC 13076, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 14053 e *Candida albicans* ATCC 90028. E isolados clínicos de *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*.

2.6.2. Preparo das suspensões microbianas

Os microrganismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) a 35°C por 24h para amostras bacterianas e 48h para amostras fúngicas. Posteriormente, cultivou-se as amostras em placas de Ágar Nutriente a 35°C pelo tempo descrito anteriormente. Colônias isoladas foi então ressuspensa em 3mL de solução fisiológica (NaCl 0,9 %) esterilizada até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL) (CLSI, 2013).

2.6.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). As placas de 96 poços estéreis foram preparadas com 150µL de caldo BHI e 150µL do produto a ser testado seguido de diluições seriadas, cada inócuo de bactéria e fungo foi transferido para os poços e levados à estufa a 35°C por 24horas (bactérias) e 48h (fungos), após o período de incubação adicionou-se o revelador de crescimento resazurina a 0,1% e realizada a leitura após 4horas de incubação. Foi utilizado no controle positivo de amostras bacteriana o cloranfenicol 0,02 mg/mL e para as amostras fúngicas, Nistatina 100.000 UI/mL. A CIM será a menor concentração da solução onde não houve crescimento bacteriano visível (CLSI, 2013).

2.6.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Serão utilizadas as placas incubadas para determinação da CIM em meio líquido para determinação da CBM. Uma alçada de cada poço foi inoculada em placas de Ágar Müller Hinton e posteriormente incubadas em ambiente à 35°C por 24h/48h. As CBM's e CFM's serão consideradas para a menor concentração da solução onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana ou fúngica) (CLSI, 2013).

2.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IRRITATIVA FRENTE À HEMÁCIAS

2.7.1. Isolamento das hemácias (Preparo da suspensão de hemácias):

Para os testes foi utilizado a metodologia proposta por Banerjee (2008) com modificações. O sangue de carneiro foi centrifugado a 3000 rpm por um período de 15 minutos, posteriormente o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente, as hemácias foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) por 3 vezes e centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos a cada lavagem, para retirada de traços de plasma e de outras impurezas. Após o processo de lavagem, as hemácias foram ressuspensas em PBS suplementado com 10mmol/L de glicose na concentração de 8×10^9 cél./mL. A solução foi conservada a 4°C.

2.7.2. Avaliação da IC₅₀ (50% de inibição de atividade hemolítica):

O extrato e os produtos manipulados de *Euterpe oleracea* Mart foram preparados na concentração de 100 mg/mL (extrato/PBS), posteriormente foram realizadas diluições seriadas em 6 tubos contendo 1mL de PBS (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32). Após a diluição, foi adicionado a suspensão de hemácias em 975µL de cada uma das diluições. Logo após, o período de incubação, as diluições foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 1 minuto, o sobrenadante foi decantado em cubeta de 1cm sendo medida a absorbância contra o branco (substância-teste diluída em PBS). Os resultados foram comparados com o tubo totalmente lisado pela água destilada que será utilizada como controle positivo (BANERJEE *et al*, 2008).

2.7.3. Hemólise

A partir dos dados obtidos no estudo da IC₅₀, foram elaboradas as curvas dose-resposta referentes ao extrato em estudo. As diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), foram incubadas com 25µL da suspensão de hemácias em PBS por 10 minutos a temperatura ambiente com agitação constante. Após 10 minutos, foram centrifugadas a aproximadamente 10.000 rpm durante 1 minuto e o grau de hemólise foi determinado no sobrenadante com a leitura a 540nm contra o branco. As leituras obtidas foram comparadas com a leitura do tubo totalmente lisado pela água destilada, de forma a calcular a concentração efetiva que causa 50% de hemólise (H₅₀). O teste foi realizado em triplicata (BANERJEE *et al*, 2008).

2.7.4. Desnaturação (ID):

Foi preparada uma solução mãe do extrato de *Euterpe oleracea* Mart em tampão fosfato-salino (PBS) na concentração de 10mg/mL, foi adicionado 975 μ L da solução mãe em tubos, após adicionou-se 25 μ L de suspensão de eritrócitos e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente em agitação constante. Após 10 minutos, foram centrifugadas a aproximadamente 10.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi decantado em cubeta de 1cm. Posteriormente, mediu-se a absorbância nos comprimentos de onda de 540 e 575nm contra o branco (extrato de *Euterpe oleracea* Mart diluído em PBS). A absorbância medida a 575nm (α) foi dividida pela absorbância medida a 540nm (β), obtendo assim a proporção α/β . Esta proporção foi usada para caracterizar o Índice de desnaturação da hemoglobina (ID) (BANERJEE *et al*, 2008). Equação para obtenção do Índice de Desnaturação:

$$(ID)\% = (R_1 - R_i) / (R_1 - R_2) \times 100$$

Onde: R_1 : proporção α/β da hemoglobina; R_i : proporção α/β da substância-teste; R_2 : proporção α/β do SDS a 0,1%.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

O açaizeiro pertence à família Arecaceae, que engloba, aproximadamente, 200 gêneros e cerca de 2600 espécies, cuja distribuição é predominante das regiões tropical e subtropical. Ocorre espontaneamente no Brasil e fora do país como na Guiana, Venezuela e Colômbia (JONES, 1995). Entretanto é na região Amazônica que essa espécie possui as maiores áreas de ocupação, mais precisamente na região do estuário do rio Amazonas, considerada como seu centro de origem e onde encontram-se densas e diversificadas populações. É também encontrado em áreas permanentemente alagadas e em terra firme, embora em densidades bem menores (CAVALCANTE, 1991).

O açaí até pouco tempo atrás era um patrimônio exclusivo dos paraenses, porém a sua popularidade se espalhou pelo país e o seu consumo também é feito em alguns países da Europa e EUA. O consumo de açaí vem aumentado à medida que novos trabalhos científicos são publicados e divulgados. Os estudos iniciais envolvendo atividades biológicas do açaí foram baseadas na descrição do uso popular pelas comunidades amazônicas e até então pesquisas são realizadas para esclarecer essas atividades biológicas. Os principais farmacógenos listados para uso medicinal foram folhas e raízes cujos foram relatados com atividades antiinflamatórias e antimálaricas; isso foi posteriormente

confirmado por estudos científicos (MARCASON *et al*, 2009; BOURDY *et al*, 2000; RUIZ *et al*, 2011).

O fruto é arredondado e pesa cerca de dois gramas. O caroço não é comestível e contém uma semente oleaginosa. A cor do fruto maduro é púrpura a quase preta. Os frutos podem ser obtidos durante todo o ano, com alta estação entre agosto a dezembro, onde apresentam melhor qualidade organoléptica (SANTOS *et al*, 2008).

A sua ação antioxidante também contribui para a prevenção de doenças. Entre os antioxidantes predominantes presentes na polpa do fruto, estão entre outros flavonóides, as antocianinas e os compostos fenólicos. Os benefícios à saúde dessas substâncias estão ligados na prevenção de doenças crônicas cujas causas primárias estão diretamente ligadas ao estresse oxidativo. (PINTO, 2014).

Sendo um dos alimentos mais promissores, na atualidade o açaí apresenta um grande potencial fitoterápico, cuja composição apresenta elementos como ‘cristais de inulina, fibras, taninos e amido de alta densidade, sendo realizadas nos últimos anos várias descobertas e experiências para a comprovação dos benefícios que o açaí pode promover (MENEZES, 2008).

4. ANÁLISES E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA

O teor de polifenóis totais medido por espectrofotometria mostrou que o extrato bruto de *Euterpe oleracea* Mart apresenta $23,24 \pm 0,7$ mg de ácido gálico/g de extrato seco. Lima *et al* 2012 em seu estudo encontrou o valor de $10,31 \pm 0,25$ mg de ácido gálico/g de extrato no extrato bruto do fruto da espécie *Euterpe edulis* Martius.

Alguns metabólitos foram identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (Tabela 1)

Tabela 1 – Compostos identificados por LC-MS e FIA-ESI-IT-MS do extrato de *Euterpe oleracea* Mart

Nº	[M- H] ⁻	MS ⁿ	Composto
1	191	167	Ácido Quinico
2	289	245; 205; 203; 175;	Catequina
3	577	289	Catechina (dímero)
4	865	847; 739; 695; 587; 577; 425; 677; 543; 451; 405; 363; 525; 499; 391; 525;	Procianidina C1
5	1151	863; 575; 289	Procianidina Tipo-A
6	1153	1135; 1068; 1027; 983; 907; 865; 847; 739; 701; 695; 575;	Tetrâmero de Catequina

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

M-H]⁻ (m/z): Massa por carga de íons; **MSⁿ** : Spectrometria da Massas de cada fragmento; **NI**: Fragmento Não Identificado.

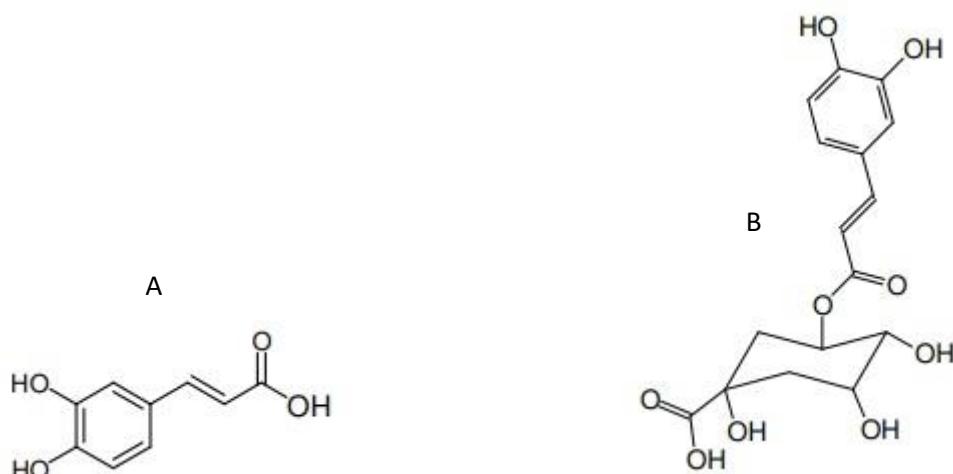
No extrato de *Euterpe oleracea* Mart foram identificados moléculas do grupo das catequinas que pertencem à família dos compostos fenólicos, e tem uma forte ação antioxidante. Os compostos fenólicos também são descritos por ter ação antimicrobiana. (TERRA *et al*, 2012).

Segundo Stapleton e Taylor (2002) existe uma relação direta entre a estrutura das catequinas e sua atividade antimicrobiana. Assim, catequinas com dihidroxilação nas posições 2'-4' ou 2'6' do anel B e dihidroxilação nas posições 5-7 do anel A, apresentam maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, por exemplo.

Moléculas de Procianidina, Procianidina C1 e Procianidina tipo-A, também foram identificadas. A Procianidina C1 é um trímero da epicatequina (epicatequina-4β-8-epicatequina-4β-8-epicatequina) e apresenta certas funcionalidades fisiológicas como antialérgicos, anticáries, anti-hipertensivo, antioxidante e crescimento de cabelo (SHOJI *et al*, 2003). A procianidina tipo-a é uma procianidina oligomérica caracterizada pela presença de uma ligação C-C [2-O-7, 4-8] ou [2-O-7, 4-6] entre duas unidades flavan-3-ol que também apresenta atividade antioxidante. (LOU *et al*, 1999)

O ácido quínico faz parte da família dos ácidos clorogênicos, junto com o ácido hidroxinamico e outros ésteres. O ácido quínico junto com o ácido cafeico (**figura 1-A**), formam um éster denominado ácido 3-cafeoilquínico (**figura 1-B**). O termo ácido clorogênico foi introduzido para designar um composto fenólico com função ácida, que conferia coloração verde ao meio aquoso quando em meio levemente alcalino exposto ao ar.

Figura 1 – A) Ácido cafeico; B) Ácido 3-cafeoilquiônico



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Esse ácido é conhecido por ser um dos fenóis mais biologicamente ativo. (GARAMBONE *et al*, 2007). Apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, tais como: antioxidante, antimicrobiano, estimulante de utilização da glicose hepática, antipirética e anti-inflamatória (SCHWAB *et al*, 2001; FARAH *et al*, 2005; GIRALDO *et al*, 2007; LOU *et al*, 1999).

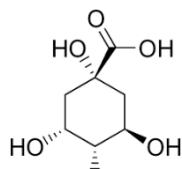
Alguns estudos mostram que quando o ácido quiônico se condensa com diaminas N-alquiladas geram amidas com atividade antimicrobiana. Almeida 2010 reportou que alguns desses compostos N-alquilados (figura 2) possuem atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 2 – Diaminas N-alquiladas derivadas do ácido quiônico

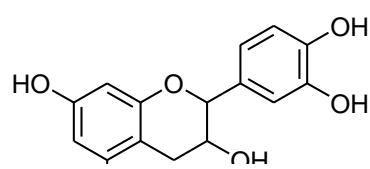


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

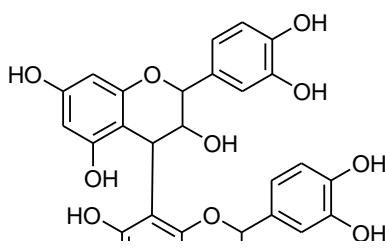
4.2. DESENHO MOLÉCULAR DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DAS FOLHAS DE *EUTERPE OLERACEA MART.*



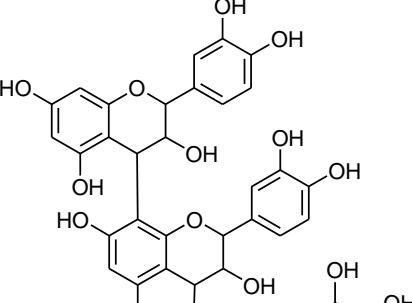
A) Ácido Quínico



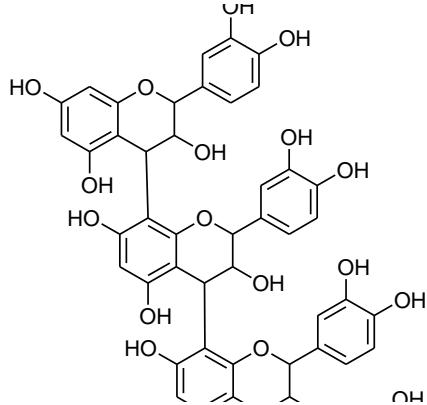
B) Catequina



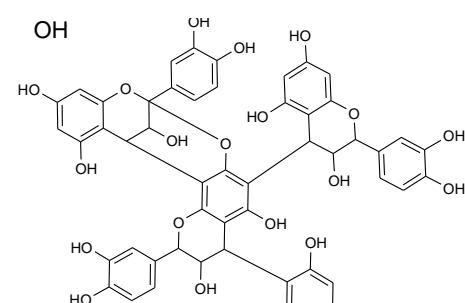
C) Catequina (dímero)



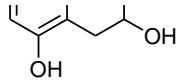
D) Procyanidin C1



E) Catequina (tetrâmero)



F) Procianidina Tipo-A



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *EUTERPE OLERACEA MART.*

A capacidade de seqüestrar o radical DPPH (expressa em percentual de inibição) exibida pelo extrato em diferentes concentrações estão representados na Tabela 2.

Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH[•], que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida. Os resultados demonstram que o percentual antioxidante é diretamente proporcional ao aumento da concentração de extrato adicionada, atingindo o valor máximo de $18,74 \pm 1,6\%$ na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Tabela 2 – Percentual de Atividade Antioxidante do extrato bruto das folhas de *Euterpe oleracea* Mart

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	TEMPO (min)		
	1 min	10 min	20 min
5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3,74±0,2	2,91±0,27	2,37±0,25
10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5,41±0,33	4,74±0,44	4,32±0,37
25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6,57±0,42	5,03±1,5	3,67±1,2
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	18,74±1,6	17,97±2,3	13,75±1,3

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Valores médios ± desvio padrão.

Duarte-Almeida *et al* (2006) encontrou valores similares de porcentagem de inibição do radical DPPH ao investigar frutos *in natura* de açaí, aproximadamente 20%.

O teor dos polifenóis e antocianinas já evidenciada na fitoquímica do extrato do açaí torna-o uma espécie vegetal com potencial para inibição de radicais livres. Os compostos fenólicos nesse sentido são responsáveis pela transferência de hidrogênio que neutraliza a ação desses radicais (BREWER, 2011). As antocianinas também possuem a habilidade de sequestrar esses radicais livres. (FIGUEIREDO *et al*, 2015).

4.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO AQUOSO DE *EUTERPE OLERACEA* MART.

O extrato de Açaí foi ressuspensido em água estéril e testado na concentração de 100mg/ml, onde conseguiu inibir o crescimento de todas as cepas de bactérias testadas. Todas as CIM obtiveram o valor de 25mg/ml. Para as cepas o extrato apresentou ação bacteriostática, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antibacteriana do extrato bruto aquoso de *Euterpe oleracea* Mart na concentração de 100mg/ml

Microorganismo	CIM	CBM	CN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25mg/ml	-*	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	25mg/ml	-*	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25mg/ml	-*	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CN: Controle Negativo (Cloranfenicol 0,1%); (-): ausência de crescimento bacteriano. (-*): Ausência de CBM.

A tabela 4 apresenta os testes realizados com fungos padrão e isolados clínicos. O extrato bruto apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas. Os valores de CIM variaram entre 6,25mg e 50mg/ml onde o menor valor de CIM foi para *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e o maior para a *Candida albicans* (ATCC 90028 e Isolado Clínico). O extrato apresentou ação fungostática em todos os microorganismos testados.

Tabela 4 - Atividade antifúngica do extrato bruto aquoso de *Euterpe oleracea* Mart na concentração de 100mg/ml

Microorganismo	CIM	CFM	CN
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	6,25mg/ml	-*	-
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	25mg/ml	-*	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	12,5mg/ml	-*	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	50mg/ml	-*	-
<i>Candida parapsilosis</i> IC	12,5mg/ml	-*	-
<i>Candida glabrata</i> IC	50mg/ml	-*	-
<i>Candida albicans</i> IC	50mg/ml	-*	-
<i>Candida tropicalis</i> IC	12,5mg/ml	-*	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; CN: Controle Negativo (Nistatina 100.000UI); (-): ausência de crescimento fungico. (-*): Ausência de CFM.

Melhorança Filho (2012) reportou que com o óleo essencial extraído da semente do açaí formou halo de inibição de 9,25mm sobre *Staphylococcus aureus* (*Coleção de Cultura Cefar Diagnóstica® CCCD – P003*) e essa atividade permaneu por 48 horas, momento em que um halo de inibição permanecia com 8,5mm. Dias-Sousa (2018) conseguiu comprovar que o extrato metanólico é eficiente da dissolução do biofilme produzido pelo *S. aureus*.

Estudos com a ação antifúngica do Açaí são escassos, o que dificulta a comparação dos resultados com outros pesquisadores. Em seu trabalho, Brito (2017) reportou que as espécies *C. tropicalis* ATCC 1369 e *C. parapsilosis* ATCC 1369 foram inibidas com os extratos da semente e da casca do açaí nas concentrações de 0,2mg e 2mg respectivamente. Bastos (2016) mostrou que o extrato etanólico do açaí também possui atividade antifúngica frente *Candida albicans*.

A *Candida parapsilosis* foi a cepa mais sensível entre os fungos e entre todos os microorganismos testados com o extrato bruto de Açaí. Essa espécie de *Candida* é a segunda espécie mais freqüentemente isolada dos pacientes. Além de ser altamente prevalente, sua biologia difere marcadamente da *C. albicans*. Pacientes com imunidade suprimida, por exemplo, correm um risco maior de infecções hospitalares, entre estes, a candidíase invasiva, que é a infecção nosocomial fúngica sistêmica mais prevalente. Nas últimas décadas, a prevalência combinada de espécies de *Candida* não-albicans superou as infecções por *Candida albicans* em várias regiões em todo o mundo. Destaca-se assim a necessidade de desenvolver um tratamento eficaz e prevenir futuros surtos. Nesse sentido o extrato de Açaí mostra-se bastante promissor como um fitoterápico eficaz. (CASTRO, 2010)

O extrato bruto do açaí possui atividade antimicrobiana frente tanto a bactérias gram-positivas quanto gram-negativas e fungos. Os microrganismos utilizados neste estudo são de interesse clínico a seres humanos, cujas são difíceis de erradicar devido à sua resistência aos antibióticos.

Os altos índices de resistência a antimicrobianos refletem a tendência epidemiológica atual do crescimento das bactérias com alto padrão de resistência, tornando-se essencial a implementação de medidas de vigilância, isolamento e racionalização do uso de antibióticos a fim de se minimizar a disseminação destes patógenos (GIL *et al*, 2018)

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO DE *EUTERPE OLERACEA MART*

Os valores de IC₅₀, expressos em mg/ml, representam a concentração do extrato necessária para causar 50% de hemólise (H₅₀) em hemácias sadias. O índice de desnaturação (ID) e a razão H₅₀/ID possibilitam classificar o produto quanto ao seu potencial irritativo de acordo com a tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Valores padrão de classificação do potencial irritativo

IN VIVO	IN VITRO (H_{50}/ID)
Não Irritante	>100
Irritante Leve	≥ 10
Irritante Moderado	≥ 1
Irritante Severo	$\geq 0,1$
Irritante Máximo	$\leq 0,1$

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Os valores dos índices citados acima para os extratos foram:

Tabela 6 - Valores de H_{50} , ID e razão H_{50}/ID do extrato das folhas de *Euterpe oleracea* Mart.

Produto	H_{50}	ID(%)	H_{50}/ID	Nível de Irritabilidade
Extrato	471,3	0,88	535,51	NI

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

H_{50} - dose efetiva que causa 50% de hemólise; ID – Índice de Desnaturação; H_{50}/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação; NI – Não Irritante ;

O resultado do extrato bruto para a relação H_{50}/ID indica que o mesmo tem baixa taxa de hemólise, resultando em uma baixa toxicidade não gerando irritabilidade às hemácias. Os estudos de atividade hemolítica para o espécie *Euterpe oleracea* Mart são excassos, no entanto Lima (2012) reportou em seu estudo que o extrato de *Euterpe edulis* Martius não apresentou atividade hemolítica o que indica uma possível aplicação medicamentosa do extrato.

A confirmação da atividade hemolítica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Os eritrócitos são células muito utilizadas para estudos de citotoxicidade in vitro, devido, principalmente, ao fácil acesso e à grande disponibilidade, permitindo a investigação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular (PASQUINI-NETTO *et al*, 2012).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, pode inferir-se que a análise fitoquímica do extrato bruto das folhas de *Euterpe oleracea* Mart identificou fitocomponentes (compostos fenólicos) e outras substâncias que possuem relação direta com as atividades biológicas testadas. O extrato apresentou uma notória atividade antioxidante cuja ação é diretamente proporcional à concentração do extrato. O extrato apresentou uma ótima atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias e fungos (padrão

e isolados clínicos) de importância clínica para o ser humano inibindo o crescimento de todas as cepas testadas. Com a investigação da atividade hemolítica comprovou-se que o extrato e bioproductos não são irritativos, apresentando baixa toxicidade às hemácias

REFERENCIAS

- ALMEIDA, C.G. *et al* Relationship between structure and antibacterial activity of lipophilic n-acyldiamines. **Biom.&Pharmacot.** v.64, p. 287, 2010
- BANERJEE, A. *et al* Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134-139, 2008.
- BARROS, L. *et al* . The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. **Ind. Crop. Prod.**, 76, 318–322. 2015
- BASTOS, I. S. **Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimarial de extratos, frações e composto obtido de plantas da região amazônica.** Dissertação, UFAM, Manaus, 84p, 2016.
- BOURDY, G. *et al* Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, 70, 87–109, 2000.
- BREWER, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.221-247, 2011.
- BRITO, L. L. **Atividade biológica do extrato de moléculas de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre biofilme de *Candida parapsilosis* e *tropicalis*.** Dissertação, UFMA, São Luís, 31-32p, 2017
- CARDOSO, O. *et al* Metallo-betalactamase VIM-2 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. **Microbiol Drug Resistance**, v. 8(2), p. 93-97, 2002.
- CASTRO, R. D. D. **Atividade Antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de candida.** 2010. 170 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- CAVALCANTE, P. **Frutas comestíveis da Amazônia.** Belém: CEJUP, 1991.271p.1991
- CLSI, Clinical and Laboratory **Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;** Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- DIAS, M. *et al* Proapoptotic activities of polyphenolics from açaí (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. **Nutrition and Cancer**. v.66 ed. 8, p. 1394-405, 2014.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(2): 446-452, abr.-jun. 2006

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. **Annual epidemiological report 2014** - Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. 2015. Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1292. Acesso em: 20/01/2023.

ESPIRIA, P. *et al* Physical and antibacterial properties of açaí edible films formulated with thyme essential oil and apple skin polyphenols. **Journal of Food Science**, v.79 ed. 5, p. 903-10, 2014

FARAH A, PAULIS T, TRUGO LC, MARTIN P R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **J. of Agric and Food Chemistry**, v. 53, p. 1505-1513, 2005.

FIGUEIREDO, F.J. *et al* Atividade antioxidante de antocianinas de frutos de quixabeira (Sideroxylon obtusifolium). **Rev. bras. plantas med. [online]**. vol.17, n.3, pp.473-479, 2015.

FRAGOSO, M. *et al* Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açaí fruit (*Euterpe oleracea* Martius) intake. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, ed.3, p. 235-41, 2012.

GALE, A.; KAUR, R.; & BAKER, W. Hemodynamic and electrocardiographic effects of açaí berry in healthy volunteers: a randomized controlled trial. **International Journal of Cardiology**, v.174(2), p. 421-3. 2014

GARAMBONE, E., ROSA, E. G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alim e Nut Araraquara**, v. 18, n.2, p.229-235, 2007

GIL, D. *et al* Características epidemiológicas de la infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en el Hospital Clínico Regional de Valdivia. **Cuadernos De Cirugía**, 14(1), 18-22, 2018.

GIRALDO, L. *et al* Lipase-catalyzes synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 41, p. 721-726, 2007

JONES, D.L. **Palms: throughout the world**. Washington: Smithsonian Institution. 1995. 410p.

KARAMAN, I. *et al* Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003

LIMA, C. P. *et al* Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.2, p.321-326, 2012.

LOU, H. *et al* A-type proanthocyanidins from peanut skins. **Phytochemistry**, v.51, p.297-308, 1999

MACHADO, E. *et al* High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1370-1374, 2007.

MARCASON, W. *et al* What Is the Açaí Berry and Are There Health Benefits?. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 109, n. 11, p. 1968, Nov 2009.

MELHORANÇA FILHO, A. L. *et al* Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* E *Staphylococcus aureus*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 598-603, July/Aug. 2012

MENEZES, S. E. M., TORRES, A. T., SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Acta Amazonica**, v. 38, p.311-316, 2008.

NOVAIS, C. *et al* Local Genetic Patterns within a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Clone Isolated in Three Hospitals in Portugal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.48 n. 9, p. 3613-3617, 2004.

ORSI, G. B.; STEFANO, L. D. Hospital-Acquired, Laboratory-Confirmed Bloodstream Infection: Increased Hospital Stay and Direct Costs. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 23(4), p.190-197, 2002.

PASQUINI-NETTO, H. *et al* Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinoideae). **Rev. bras. plantas med.** vol.14 no.4 Botucatu, 2012

PINTO, G. B. **Prospecção Tecnológica das atividades industriais do açaí em bases de patentes gratuitas**. IFRJ Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus de Realengo. RJ, 2014.

PORTINHO, J.; ZIMMERMANN, L.; BRUCK, M. Efeitos Benéficos do Açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5 ed. 1, p.15-20, 2012.

ROCHA, C. Q. *et al* Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of natural products**, v. 77, n. 6, p. 1345-1350, 2014. (Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity)

RUIZ, L. *et al* Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malária. **Journal of Ethnopharmacology**, 133, 917–921, (2011).

SANTOS, G. M. *et al* Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.58, n.2, p.187-192, 2008.

SCHWAB, D. *et al* Hepatic uptake of synthetic chlorogenic acid derivatives by the organic anion transport proteins. **J. of Pharmacology and Exp. Therap.**, v. 296, n.1, p. 91-98, 2001.

SHOJI, T. *et al* Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3806-3813, 2003.

SILVA, J. K. R. Estudo químico e das propriedades biológica dos óleos essenciais e extratos de espécies de *Piper* da Amazônia Oriental. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.

STAPLETON, P. D.; TAYLOR, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Sci Prog**, v. 85, p. 57-72, 2002

TERRA, N. *et al* Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Rama Forte. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 15, n. 2, p. 118-124, abr./jun. 2012.