

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VÍVIEN PATRÍCIA GARBIN

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DOS FRUTOS,
ÓLEOS DAS SEMENTES E FUNGOS ISOLADOS DA PALMEIRA JUÇARA
(*Euterpe edulis* MARTIUS 1824)**

Curitiba

2011

VÍVIEN PATRÍCIA GARBIN

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DOS
FRUTOS, ÓLEOS DAS SEMENTES E FUNGOS ISOLADOS DA
PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis* MARTIUS 1824)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, Curso de Pós Graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia. Área de concentração: Microbiologia. Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientação: Prof^a. Dr^a. Patricia do Rocio Dalzoto.

Apoio: Embrapa Florestas – Dr^a.Cristiane Vieira Helm e Dr. Alvaro Figueredo dos Santos

Curitiba

2011

"Eu quero saber como Deus criou este mundo. Eu não estou interessado neste ou naquele fenômeno, no espectro deste ou daquele elemento. Eu quero saber os pensamentos dele;

o resto são detalhes."

(ALBERT EINSTEIN)

*"- Pra mim, missão dada é missão cumprida. Estamos atendidos?"
(CAPITÃO NASCIMENTO – TROPA DE ELITE)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel e prof^a Dr^a Patricia do Rocio Dalzoto pela chance que me deram. Ao confiar em mim, mesmo sem saber do que eu era capaz, e muito embora eu não tenha sequer me aproximado do ideal de mim mesma que tinha ao entrar no Mestrado, elas sempre me incentivaram com sorrisos e palavras doces, sendo um pouco mães, amigas, irmãs, conselhereiras amorosas. Levo no coração dois exemplos de conduta profissional e de caráter que pretendo seguir para toda a vida.

À Embrapa Florestas pela parceria e pela oportunidade oferecida para este estudo, sobretudo pela mão amiga e cordial, pelas dicas e pelos conselhos da Dr^a. Cristiane Helm e pelas dicas do Dr. Alvaro Figueredo dos Santos, além da ajuda maravilhosa dos técnicos de laboratório Dayanne e Gelson, que me incentivaram e deram muita ajuda. Muita mesmo!

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento durante meu processo de formação, sobretudo ao prof. Dr. Alexandre Bellacruz da UNIVALI, pelos ótimos conselhos, pelo treinamento e por me mostrar que ainda há altruísmo genuíno neste mundo.

Aos meus familiares, em especial meus pais, Luiz e Angela, meus avós Alfredo e Rosa, minha tia Adriana, meu tio Fabiano e minha prima Júlia (Jujuba), prima Fernanda e Gaby, minha irmã Andressa. Desculpem pela ausência e obrigada por suportar tudo que vocês passaram comigo...

À minha querida amiga Taís, eterna irmã e comadre, por estar ao meu lado em todos os momentos bons e ruins, dando força, fazendo piadas, compartilhando angústias, até dando o pouco que possuía, sem nada esperar em troca. Lembrarei de você e estarei do seu lado para sempre!!

A todos meus colegas de laboratório: Mariana, Sabina, Paulo, Alexandre, Juliana, Diogo, João e Rafaela que sempre me apoiaram e auxiliaram durante meu período em laboratório, além das risadas, dos cafés, dos bons conselhos e das faxinas. Agradeço sobretudo a meu querido amigo Bruno, que como meu estagiário agüentou poucas e boas, mas teve coragem de seguir até o fim!

Obrigado a todos os meus amigos de mestrado por sempre estarem ao meu lado durante o mestrado: Fagner (o que mais elevava minha auto estima), Luiz Felipe (irmão de coração), Janaína (fashion days), Max (אבירי החייל), Camila, Alceu, Isabel, Elisa, Bruno e Breno (dupla sertaneja), Juliana da Parasito, André China (água crocante), André Catarina (Dry Martini), Déberli, Ricardo e tantos outros que conheci.

A todos que estiveram do meu lado: Micheli, Kelly, Rhicardo, Freddy, Patrícia, Nana, Lico, Ramon, Gica, Viviane, Magda, Derli, Wagner, Luci e tantos outros, de perto ou de longe.

E a Deus, a quem tudo pertence, pela misericórdia infinita e amor incondicional. Perdoa meus pecados, pois a ti toda glória e poder. Amén!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA E DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>E. edulis</i>	19
2.2. OCORRÊNCIA E ASPECTOS ECOLÓGICOS	22
2.3. COMERCIALIZAÇÃO	23
2.4. ESTUDOS DE BIOATIVIDADE COM O GÊNERO <i>Euterpe</i>	24
2.5. COMPOSTOS FENÓLICOS	26
2.6. ANÁLISES QUÍMICAS E NUTRICIONAIS NO GÊNERO <i>Euterpe</i> sp.	28
2.7. FUNGOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. GERAL	33
3.2. ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. COLETA DOS FRUTOS DE <i>Euterpe edulis</i>	35
4.2. MICRORGANISMOS UTILIZADOS	35
4.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS E SEMENTES	35
4.3.1. Determinação de umidade	36
4.3.2. Determinação de sólidos solúveis totais	36
4.3.3. Quantificação de lipídeos	36
4.3.4. Determinação de proteínas	36
4.3.5. Quantificação de resíduo mineral fixo (cinzas)	36
4.3.6. Determinação de sais minerais	36
4.4. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DOS FRUTOS	37
4.5. MACRODILUIÇÃO EM CALDO E ÁGAR (OKEKE <i>et al.</i> 2001, PRETTO 2005)	37

4.6. ÓLEOS DAS SEMENTES	39
4.7. ISOLAMENTO FÚNGICO	39
4.8. TESTE ANTIMICROBIANO POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR (OKEKE <i>et al.</i> 2001, OSTROSKY <i>et al.</i> 2008)	41
4.9. MEIO MODIFICADO COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO DOS FRUTOS	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS E SEMENTES	44
5.2. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DOS FRUTOS	47
5.3. ÓLEOS DAS SEMENTES	50
5.4. ISOLAMENTO FÚNGICO	50
5.5. TESTE ANTIMICROBIANO POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR	59
5.6. MEIO MODIFICADO COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO DOS FRUTOS	62
6. CONCLUSÕES	75
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	76
8. REFERÊNCIAS	77
APÊNDICES	85
SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA	85
Solução salina	85
Meio Batata Dextrose Ágar	85
Meio Ágar Mueller Hinton	86
Meio Sabouraud	86
Meio Batata Dextrose Ágar modificado	86
Meio Sabouraud modificado com extrato	87

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Composição nutricional dos frutos da palmeira juçara.	44
QUADRO 02 - Sais minerais dos frutos da palmeira juçara.	44
QUADRO 03 - Fungos epifíticos e endofíticos isolados dos frutos de <i>E. edulis</i> .	50
QUADRO 04 - Morfotipos de fungos isolados dos frutos de <i>E. edulis</i> .	57
QUADRO 05 - Resultados dos testes antimicrobianos com fungos endofíticos e epifíticos isolados de <i>E. edulis</i> em meio BDA.	60
QUADRO 06 - Resultados dos testes antimicrobianos com fungos endofíticos e epifíticos isolados de <i>E. edulis</i> em meio SBR.	61
QUADRO 07 - Resultados dos testes antimicrobianos dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de <i>E. edulis</i> , cultivados em meio BDA modificado por adição de extrato hidroalcólico dos frutos (meio BDAA).	65
QUADRO 08 - Resultados dos testes antimicrobianos dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de <i>E. edulis</i> , cultivados em meio Sabouraud modificado por adição de extrato hidroalcólico dos frutos (meio SBRA).	66
QUADRO 09 - Comparação dos resultados dos testes antimicrobianos de fungos endofíticos e epifíticos isolados de <i>E. edulis</i> , cultivados em meio BDA, meio Sabouraud, meio BDA ou meio Sabouraud acrescido de extrato hidroalcólico dos frutos (BDAA e SBRA, respectivamente), por 7 dias a 28° C.	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Classificação taxonômica de <i>Euterpe edulis</i> segundo CRONQUIST 1981.	19
FIGURA 02 - Palmeira Juçara.	21
FIGURA 03 – Estrutura química de flavonóide.	28
FIGURA 04 – Aspecto da macrodiluição em concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL, controle negativo e controle positivo.	38
FIGURA 05 – Aspecto do produto final obtido pela última metodologia de extração testada.	47
FIGURA 06 - <i>Mycelia sterilia</i> AFS 6 em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	50
FIGURA 07 - <i>Mycelia sterilia</i> AFL 5A em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	50
FIGURA 08 - <i>Mycelia sterilia</i> AFS 18 em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	51
FIGURA 09 - <i>Mycelia sterilia</i> AFL 2 em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	51
FIGURA 10 - <i>Mycelia sterilia</i> AFL 6 em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	51
FIGURA 11 - <i>Mycelia sterilia</i> AFS 6 B em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	52
FIGURA 12 - <i>Mycelia sterilia</i> AFS 8 em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	52
FIGURA 13 - <i>Mycelia sterilia</i> AFS 16 em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	52
FIGURA 14 - <i>Mycelia sterilia</i> AFS 17 A em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	53
FIGURA 15 - <i>Mycelia sterilia</i> AFS 17 B em meio BDA , a 28° C por 6 dias.	53
FIGURA 16 – <i>Fusarium</i> spp. AFS 8 em meio BDA.	53
FIGURA 17 – <i>Alternaria</i> spp. AFS 20B em meio BDA.	54
FIGURA 18 – <i>Penicillium</i> spp. AFS 2 em meio BDA.	54
FIGURA 19 – <i>Penicillium</i> spp. AFL 0 em meio BDA.	54
FIGURA 20 – <i>Penicillium</i> spp. AFL 4 em meio BDA.	55
FIGURA 21 – <i>Trichoderma</i> spp. AFL 10 em meio BDA.	55
FIGURA 22 – <i>Acremonium</i> spp. AFL SEMENTE em meio BDA.	55
FIGURA 23 - <i>Aspergillus</i> spp. AFS 7 em meio BDA.	56
FIGURA 24 – <i>Aspergillus</i> spp. AFS 28 em meio BDA.	56
FIGURA 25 - <i>Penicillium</i> spp. AFL 0 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias.	62
FIGURA 26 – <i>Trichoderma</i> spp. AFL 10 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias.	62

FIGURA 27 – <i>Acremonium</i> spp. AFL SEMENTE em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias.	63
FIGURA 28 - <i>Penicillium</i> spp. AFS2 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias.	63
FIGURA 29 – <i>Aspergillus</i> spp. AFS 28 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias.	63
FIGURA 30 – <i>Mycelia sterilia</i> AFL 5B em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias.	64
FIGURA 31 - <i>Penicillium</i> spp. AFL 1 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias.	64
FIGURA 32 - Teste antimicrobiano contra MRSA.	67
FIGURA 33 - Teste antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> .	68
FIGURA 34 - Teste antimicrobiano contra <i>C. albicans</i> .	68
FIGURA 35 - Teste antimicrobiano contra <i>E. coli</i> .	68
FIGURA 36 - Teste antimicrobiano contra MRSA.	69
FIGURA 37 - Teste antimicrobiano contra MRSA	69
FIGURA 38 - Teste antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> .	69
FIGURA 39 - Teste antimicrobiano contra <i>P. aeruginosa</i> .	70
FIGURA 40 - Teste antimicrobiano contra <i>C. albicans</i> .	70
FIGURA 41 - Teste antimicrobiano contra <i>E. coli</i> .	70

LISTA DE ABREVIATURAS

©	Patente registrada
µg	Microgramas
AFL	“açai fruto limpo”
AFL-SEMENTE	“açai fruto limpo – semente”
AFS	“açai fruto sujo”
atm	Atmosfera
BDA	Meio Batata Dextrose Ágar
BDAA	Meio Batata Dextrose Ágar modificado com extrato hidroalcolico de <i>E. edulis</i>
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
g	Gramas
HPLC-MS/MS	Detector de massa por espectrofotometria e arranjo fotodiodo
kg	Quilograma
m	Metros
mg	Miligramas
MH	Meio Mueller Hinton
min	minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mm ²	Milímetros quadrados
MRSA	<i>S. aureus</i> metilcilina aminoglicosídeo resistente
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros

° C	Graus Celsius
ORAC	Capacidade de absorção de Oxigênio radical
pH	Potencial de hidrogênio iônico
S	Sul
s/n	Sem data definida
SBR	Meio Sabouraud
SBRA	Meio Sabouraud modificado com extrato hidroalcolico de <i>E. edulis</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta
W	Oeste
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
ρ	Rho

RESUMO

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DOS FRUTOS, ÓLEOS DAS SEMENTES E FUNGOS ISOLADOS DA PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis* MARTIUS 1824)

Autora: Vivien Patrícia Garbin

Orientação: Prof.^a Dr.^a Ida Chapaval Pimentel, Prof.^a Dr.^a Patricia do Rocio Dalzoto.

Apoio: Dr.^a Cristiane Vieira Helm e Dr. Alvaro Figueredo dos Santos

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças. Sendo assim, entre inúmeras espécies vegetais a serem investigadas destacam-se as espécies da família Arecaceae (Palmae) e dentro desta família botânica apresenta-se a palmeira juçara (*Euterpe edulis*), tipicamente encontrada na mata atlântica brasileira e muito pouco pesquisada, embora esteja ameaçada de extinção. *Euterpe edulis* é uma espécie que apresenta estipe único, sendo incapaz de produzir perfilhos e rebrota, o que acarreta na morte da planta após corte para extrair o palmito. A palmeira juçara é descrita como sendo usada contra picadas de escorpião, anemia, dores abdominais, hemorragias e mordidas de cobra.

Este estudo teve por objetivos: Determinar umidade, sólidos totais, lipídeos, proteínas, resíduo mineral fixo (cinzas) e sais minerais da polpa, da casca das sementes e das sementes dos frutos de *E. edulis*; otimizar métodos de obtenção de extrato hidroetanólico dos frutos e procedimentos para extração de óleos das sementes de *Euterpe edulis*; verificar a ação inibitória do extrato e do óleo de *E. edulis* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231; isolar fungos epifíticos e endofíticos dos frutos e sementes de *E. edulis*; verificar se os fungos isolados apresentam ação inibitória contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Staphylococcus aureus* metilcilina aminoglicosídeo resistente (MRSA); determinar se os fungos testados apresentam diferenças em sua ação antimicrobiana quando cultivados em meio BDA e meio Sabouraud; pesquisar se há alterações na ação antimicrobiana dos fungos testados em condições de crescimento diferenciado, por adição do extrato hidroetanólico dos frutos ao meio de cultura.

No presente estudo, os frutos foram coletados na região da Serra do Mar Paranaense. Foram realizadas 3 colheitas, nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2009, resultando em aproximadamente 20 kg. Para o teste de atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e inóculos de *Candida albicans* ATCC 10231. As análises de umidade, teor de sólidos solúveis totais, proteínas, cinzas, fibras, sais minerais e lipídeos foram realizadas em conjunto com a Embrapa Florestas, baseados em métodos utilizados por INSTITUTO ADOLFO LUTZ 2008. Os frutos de *E. edulis* foram submetidos ao processo de extração conforme método adaptado de NAZARÉ *et al.* (2002). O teste antimicrobiano foi feito por macrodiluição em caldo e macrodiluição em ágar. O último extrato testado, realizado apenas com etanol puro, apresentou atividade contra *Candida albicans*, mas apenas em uma das 5 baterias de teste.

As sementes com casca foram submetidas a extração a quente em Soxhlet e a frio em maceração, pelo protocolo INSTITUTO ADOLFO LUTZ 2008. A extração de óleo das sementes dos frutos de *E. edulis* apresentou diferenças no rendimento quando feita a

quente ou a frio. O óleo extraído a frio rendeu 4,504g aproximadamente. Este óleo rendeu mais que o óleo extraído a quente (aproximadamente 0,58g), sendo este de cor dourada e com odor menos intenso.

Para isolamento dos fungos epifíticos e endofíticos, seguiu-se a metodologia de STONE *et al.* 2004 e AZEVEDO 1999, adaptada. O isolamento fúngico levou à identificação de 21 isolados endofíticos na polpa dos frutos, 3 nas sementes, e 32 isolados epifíticos, totalizando 56 isolados. Os isolados fúngicos foram divididos em 16 morfogrupos, segundo características macromorfológicas semelhantes. Foram realizados testes antimicrobianos por perfuração em ágar com sete fungos endofíticos, sete fungos epifíticos e um fungo endofítico isolado da semente, em meio BDA e Sabouraud. Dos 15 fungos testados, 6 fungos apresentaram atividade contra *S. aureus* em meio BDA, e 4 fungos atuaram contra MRSA em meio BDA. Em meio Sabouraud, *Trichoderma* spp. apresentou atividade contra *S. aureus* e *E. coli*. O fungo *Penicillium* spp. 4 atuou contra *C. albicans*. 3 fungos testados apresentaram atividade contra MRSA. Os testes demonstram que o metabólito produzido pelos fungos pode ter boa capacidade de difusão em ágar MH, pois foram observados halos de até 16 milímetros de diâmetro (*Aspergillus* spp.). O isolado mais efetivo foi *Trichoderma* spp, que teve atividade contra 3 organismos diferentes (*S. aureus*, *E. coli* e MRSA) em meio Sabouraud. A composição do meio pode levar a uma resposta diferenciada dos fungos frente às cepas utilizadas.

Foi realizado o crescimento de 8 fungos dentre os isolados, em meio acrescido de extrato hidroalcolico dos frutos de *E. edulis*, para examinar a possibilidade de apresentarem diferenças na sua atividade antimicrobiana. Macroscopicamente, 2 fungos (*Mycelia sterilia* 2 e *Acremonium* spp.) apresentaram mudanças na coloração no verso da colônia. O teste antimicrobiano mostrou inibição da atividade antimicrobiana em 3 fungos em meio BDAA, e em *Trichoderma* spp. nos dois meios. Houve alteração do diâmetro do halo de inibição em 2 fungos (nos dois meios utilizados para crescimento) e em *Acremonium* spp. em meio BDAA. Observou-se também atividade antimicrobiana de alguns fungos contra cepas que anteriormente não inibira (*Penicillium* spp. 1 e *Aspergillus* spp. contra *E. coli*, *P. aeruginosa* (apenas para *Penicillium* spp.1), e *C. albicans*; *Penicillium* spp. 2 contra *S. aureus*; *Acremonium* spp. contra *S. aureus* e *C. albicans*; e *Penicillium* spp. 4 contra *S. aureus* e MRSA).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram uma possível interação dos fungos isolados com o extrato oriundo da planta hospedeira.

PALAVRAS CHAVE: *Euterpe edulis*, extrato, óleo, fungos isolados, atividade antimicrobiana, interação fungo-hospedeiro

ABSTRACT

ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF FRUIT OILS OF SEEDS AND FUNGI ISOLATED FROM JUSSARA PALM (*Euterpe edulis* Martius 1824)

Author: Vivien Patricia Garbin

Orientation: Prof.^a. Dr.^a Ida Chapaval Pimentel, Prof.^a. Dr.^a. Patricia do Rocio Dalzoto.

Support: Dr.^a.Cristiane Vieira Helm e Dr. Alvaro Figueredo dos Santos

Many plants from Brazilian biomes, such as the Cerrado, the Amazon and Atlantic forest have been used as natural medicines by local populations in the treatment of various diseases. Thus, among numerous plant species to be investigated include whether the species of the family Arecaceae (Palmae) and within this botanical family presents the jussara palm (*Euterpe edulis*), typically found in the Brazilian rainforest and very little investigated, although endangered. *Euterpe edulis* is a single species whose stem, being unable to produce tillers and regrowth, resulting in the death of the plant after cutting to extract the palm. The palm juçara is described as being used against scorpion stings, anemia, abdominal pain, bleeding and snake bites.

This study aimed to: determine moisture, total solids, lipids, proteins, ash (ash) and minerals from the pulp, peel, seeds and fruit seeds of *E. edulis*; optimize methods for obtaining hydroalcoholic fruit and procedures for extracting oils from seeds of *Euterpe edulis*; verify the inhibitory action of the extract and oil of *E. edulis* against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231; Epiphytic and endophytic fungi isolated from fruits and seeds of *E. edulis*; verify that the isolated fungi exhibit inhibitory activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Staphylococcus aureus* metilcilina aminoglycoside resistant (MRSA), to determine if the fungi tested differ in their action antimicrobial when cultured on PDA and Sabouraud; search for changes in the antimicrobial action of the fungi tested in different growing conditions, the addition of hydroalcoholic fruit to the culture medium.

In this study, the fruits were collected in the Serra do Mar Paranaense. Three harvests were conducted during the months of October, November and December 2009, resulting in approximately 20 kg. To test the antimicrobial activity were used strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and inocula of *Candida albicans* ATCC 10231. Analyses of moisture, soluble solids, protein, ash, fiber, minerals and lipids were carried out jointly with Embrapa Forestry, based on methods used by INSTITUTO ADOLFO LUTZ 2008. The fruits of *E. edulis* were subjected to the extraction process according to a method adapted from NAZARETH *et al.* (2002). The antimicrobial test was done by broth macrodilution and agar macrodilution. The final extracts tested, only performed on pure ethanol, showed activity against *Candida albicans*, but only one of five test batteries.

The shelled seeds were subjected to Soxhlet extraction in hot and cold maceration, the protocol INSTITUTO ADOLFO LUTZ 2008. The extraction of oil from the fruit seeds of *E. edulis* showed differences in yield when done hot or cold. The oil extracted from cold yielded

4.504 g approx. This yielded more oil than the oil extracted from the hot (approximately 0.58 g), which is gold in color and less intense odor.

To isolate the fungi epiphytic and endophytic followed the methodology of Stone *et al.* AZEVEDO 2004 and 1999, adapted. The isolation led to the identification of fungal endophytes 21 in the pulp, the third seed, and 32 epiphytic isolates, totaling 56 isolates. The fungal isolates were divided into 16 morfogrupos second similar morphological features. Antimicrobial tests were carried out by punching the agar with seven endophytes, epiphytic fungi and seven an endophytic fungus isolated from the seed, on PDA and Sabouraud. Of the 15 fungi tested, six showed activity against fungi *S. aureus* on PDA, and four fungi were active against MRSA on PDA. In Sabouraud, *Trichoderma* spp. showed activity against *S. aureus* and *E. coli*. The fungus *Penicillium* spp. 4 acted against *C. albicans*. Three fungi tested showed activity against MRSA. Tests show that the metabolite produced by fungi can have good capacity of MH agar diffusion, since zones were observed up to 16 mm in diameter (*Aspergillus* spp.). The single most effective was *Trichoderma* spp, which had activity against three different organisms (*S. aureus*, *E. coli* and MRSA) in Sabouraud. The composition of the medium can lead to a differential response against the strains of fungi used.

Growth was conducted in August among the fungi isolated in medium supplemented with hydroalcoholic extract of fruits of *E. edulis*, to examine the possibility of presenting differences in their antimicrobial activity. Grossly, two fungi (*Mycelia sterilia* 2 and *Acremonium* spp.) Showed changes in color on the reverse of the colony. The antimicrobial test showed inhibition of antimicrobial activity in March amid BDAA fungi, and *Trichoderma* spp. in two ways. There was a change in the diameter of inhibition zone in two fungi (in the two media used for growth) and *Acremonium* spp. amid BDAA. It was also observed antimicrobial activity against strains of fungi that previously were not inhibited. The results of this study demonstrate a possible interaction of fungi isolated with the extract from the plant host.

KEYWORDS: *Euterpe edulis*, extract, oil, fungi, antimicrobial activity, host-fungus interaction

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, o homem tem utilizado as plantas para o tratamento de doenças infecciosas. Muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos no tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica (GURIB-FAKIM, 2006; PRETTO, 2005). As pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar os fitoterápicos já existentes vêm reassumindo papel importante nos últimos anos. Há uma dificuldade em selecionar as espécies vegetais que devem ser investigadas quanto ao seu potencial farmacológico, levando-se em conta a imensa quantidade de espécies a serem exploradas. Por isso, os relatos da medicina popular costumam ser eficazes na identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas, auxiliando nas pesquisas com plantas medicinais (LARKINS e WYNN 2004; PRETTO, 2005). Nas últimas décadas, a busca de novos agentes antimicrobianos tem sido o foco de grupos de pesquisa no campo da Etnofarmacologia e da Farmacognosia (GURIB-FAKIM 2006; RÍOS e RECIO, 2005).

Desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da ciência farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antimicrobianos desencadeou resistência bacteriana. (GURIB-FAKIM 2006). A resistência a agentes antimicrobianos é grave e preocupante e requer não somente o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, mas também novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas.

A busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, ganhou importância (YUNES e CALIXTO, 2001). Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças. Sendo assim, entre inúmeras espécies vegetais a serem investigadas destacam-se as espécies da família Arecaceae (Palmae), que apresenta em sua composição química uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos em seus frutos, caules, folhas e raízes, dentre eles as

antocianinas, compostos da família dos flavonóides, de grande interesse medicinal (SOSNOWSKA e BALSLEV 2009; CUSHNIE e LAMB 2005). Apesar de estas antocianinas serem previamente conhecidas, pouco se sabe sobre as suas atividades biológicas, e o potencial destas moléculas em diversas atividades, como antitumoral, por exemplo, têm sido documentadas.

A família Palmae (referida como Arecaceae) é bastante diversificada em termos estruturais e de habitat, com cerca de 2.600 espécies encontradas em quase todo tipo de ambiente, de florestas tropicais a desertos. Poucas plantas têm desempenhado um papel mais importante como fonte de matérias-primas para alimentação, construção, e outras funções da vida diária de culturas tradicionais (LEE e BALICK, 2008). Dentre as diversas estudadas, apresenta-se a palmeira juçara (*Euterpe edulis*), tipicamente encontrada na mata atlântica brasileira e muito pouco pesquisada, embora esteja ameaçada de extinção.

Um aspecto importante quanto ao estudo desta família botânica refere-se ao isolamento e identificação de fungos epifíticos e endofíticos. Sabe-se que alguns gêneros de fungos epifíticos e endofíticos apresentam atividade medicinal, sobretudo antimicrobiana (YU *et al.* 2010; OWNLEY *et al.*, 2008). Estes fungos possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários diversos, que exibem uma variedade de atividades biológicas. Há necessidade de incluir a pesquisa de fungos endofíticos na triagem de organismos produtores de metabólitos bioativos e de novos medicamentos (SURYANARAYANAN *et al.*, 2009).

Em vista disso, este trabalho teve como objetivos a pesquisa do potencial antimicrobiano dos frutos de *Euterpe edulis*, (extrato dos frutos, óleo das sementes) contra micro-organismos patógenos humanos. Ainda, foram isolados fungos epifíticos e endofíticos dos frutos e sementes, de modo a determinar seu potencial antagonista contra estes mesmos patógenos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA E DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *E. edulis*

Euterpe edulis caracteriza-se por ser uma palmeira de caule ereto, tipo estipe, por este motivo sendo classificada dentro da família Arecaceae (FIGURA 01). A palavra *Euterpe* significa “a Doadora de Prazeres”, do grego *eu* (bom, bem) e *τέρπ-εω* ('dar' prazer), em relação ao magnífico aspecto desta palmeira. Ela foi uma das nove musas da mitologia grega, filha de Zeus e Mnemósine e nomeado a musa da música; *edulis*, do latim *edulis* (comestível) (INBIOVERITAS 2009).

Reino Plantae
Superdivisão Spermatophyta
Divisão Magnoliophyta
Classe Liliopsida
Subclasse Arecidae
Superordem Arecanae
Ordem Arecales
Família Arecaceae (Palmae)
Subfamília Arecoideae
Gênero <i>Euterpe</i>
Espécie <i>Euterpe edulis</i>
Martius Hist. Nat. Palm. 2:33, 1824

FIGURA 01 - Classificação taxonômica de *Euterpe edulis* segundo CRONQUIST 1981 Fonte: CRONQUIST 1988.

Possui caule ereto, cilíndrico, que não brota na base, solitário do tipo estipe, raramente em agrupamentos, com 5 a 15 m de altura e 10 a 15 cm de diâmetro. Entre o término do tronco e a parte onde nascem as folhas, há uma seção verde, mais grossa que o tronco, formada pela base do conjunto de folhas (FIGURA 2A). Dentro desta seção encontra-se a parte comestível da palmeira (HENDERSON 2000). No ápice encontra-se um tufo de folhas alternas pinadas de cor verde-oliva a verde-escuro, em número de 8 a 15, de 1,5 a 3 m de comprimento. O pecíolo tem 13

a 54 cm de comprimento e é coberto por escamas escuras (marrom, marrom-avermelhadas ou pretas). Cada folha tem de 38 a 70 unidades (pinas) de cada lado, regularmente distribuídas ao longo do eixo central (raque). Na base do estipe encontra-se um cone visível de raízes de cor marrom até vermelho (FIGURA 2B). As raízes do palmiteiro, assim como outras palmeiras, constituem-se de um denso emaranhado de unidades com, aproximadamente, a mesma espessura. Se uma raiz é bastante danificada, ela morre e é, gradualmente, substituída por uma nova.

Cada planta produz de 1 a 5 inflorescências que são intrafoliares e mais ou menos horizontais quando abrem as flores. As inflorescências tipo panícula possuem flores pequenas (5 mm de diâmetro) masculinas e femininas, de coloração amareladas, numerosas, podendo ocorrer algumas só com flores masculinas, ou distribuídas em grupo de três, uma feminina entre duas masculinas (FIGURA 2C). Os frutos formados são carnosos, fibrosos e globosos com 1 a 1,4 cm de diâmetro, do tipo drupa (HENDERSON 2000). A casca (epicarpo) é roxo escuro a preta quando os frutos amadurecem, cor característica de frutos com antocianinas como pigmento, com polpa e fibras (mesocarpo) formando uma camada protetora para as sementes globosas em seu interior (FIGURA 2D e 2E) (HENDERSON 2000). A semente é quase esférica, parda-grisácea a pardo-amarelada, envolta por uma cobertura fibrosa, com até 10 mm de diâmetro de diâmetro (FIGURA 2E) (HENDERSON 2000).

O número de espécies do gênero *Euterpe* não está claramente definido e tem sido objeto de constantes revisões. A literatura cita 30 espécies do gênero *Euterpe* na América Central e do Sul (MAC FADDEN 2005). Segundo HENDERSON (2000), *Euterpe*, juntamente com *Prestoea*, *Oenocarpus* (incluindo *Jessenia*), *Hyospathe* e *Neonicholsonia* fazem parte da subtribo Euterpeinae, que é totalmente neotropical contendo 32 espécies, 7 das quais são *Euterpe*. Estas são amplamente distribuídas na América Central e do Sul, ocupando florestas de terras baixas e montanhas úmidas. No Brasil cinco espécies foram constatadas: *Euterpe edulis* Martius (juçara), *Euterpe catinga* Wallace (açazinho), *Euterpe oleracea* Martius (açazeiro), *Euterpe longibracteata* Barbosa Rodrigues (açai da terra firme), *Euterpe precatória* Martius (açazeiro) (HENDERSON 2000). Embora o açai e a palmeira precatória sejam relativamente mais bem estudados, a palmeira juçara possui notável relevância, por seu papel ecológico e econômico. Desta espécie extrai-se o palmito comum.



FIGURA 02 - Palmeira juçara. A: aspecto da copa. B: raízes de *E. edulis*. C: inflorescência de *E. edulis*. D: frutos em diversas fases de maturação. E: frutos maduros em detalhe. F: sementes de *E. edulis* após despolpa. FONTE: Autor 2010; INBIOVERITAS 2010.

Euterpe edulis é uma espécie que apresenta estipe único, sendo incapaz de produzir perfilhos e rebrota, o que acarreta na morte da planta após corte para extrair o palmito (TSUKAMOTO FILHO *et al.* 2001). Atualmente a espécie *E. edulis* é um dos produtos mais explorados na Floresta Atlântica (REIS *et al.* 2000A). Desde a chegada dos primeiros colonizadores, a exploração dos recursos (fauna e flora)

encontrados na Mata Atlântica tem sido puramente extrativista, sem nenhuma consideração com a conservação das espécies ou dos habitats (MARCOS e MATOS 2003). Hoje o palmito de *E. edulis* é comercializado nos estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, sendo o comércio mais intenso nos três primeiros. O Brasil é responsável por 85% do comércio internacional de palmito (PEREIRA 2000). Considerando que a juçara é uma palmeira que corre o risco de extinção devido à extração clandestina do palmito, o uso do fruto na alimentação humana e nas diversas indústrias, tanto cosmética quanto farmacológica, apresenta-se como uma alternativa de grande potencial econômico e ambiental, ao agregar valor aos remanescentes florestais da região e ao contribuir para a preservação da espécie, através de manejo sustentável (FLORIANO *et al.* 1988; PEREIRA 2000).

2.2. OCORRÊNCIA E ASPECTOS ECOLÓGICOS

A palmeira juçara ocorre no estrato médio da Floresta Ombrófila Densa, desde o sul da Bahia (15° S) até o norte do Rio Grande do Sul (30° S), com distribuição preferencial ao longo do litoral brasileiro, no domínio Florestal Tropical Atlântica, mas também adentrando ao Norte da Argentina e Leste do Paraguai (57° W) (REIS *et al.* 2000B). A espécie ocorre também em regiões com estacionalidade (Florestas Estacionais), tolerando uma estação seca de até três meses, com déficit hídrico leve, como no sul da Bahia e sul do Mato Grosso do Sul, e em alturas que variam do nível do mar até 1000 m de elevação. Atualmente, as populações naturais da espécie estão em grande fragmentação e reduzida área de ocorrência (REIS *et al.* 2000B). *E. edulis* ocupa o estrato médio da floresta, é uma planta tolerante à sombra e dominante neste estrato. Não há a necessidade de abrir grandes clareiras no dossel da floresta para sua exploração, mantendo a estrutura e a composição das áreas florestais manejadas (REIS *et al.* 2000A). Em relação à fecundação *E. edulis* pode ser considerada autocompatível, mas com reprodução predominantemente alógama, polinizada por uma grande diversidade de insetos (entomófila), e o vento (anemofilia) desempenhando algum papel na polinização (MANTOVANI e MORELLATO 2000). *Euterpe edulis* é uma espécie perenifólia, ombrófila, mesófila ou levemente higrófila (LORENZI, 1992). A palmeira juçara é uma palmeira de floração anual e sazonal, sendo o pico de oferta de frutos entre

setembro e outubro. Os frutos amadurecem de abril a novembro, em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul; de maio a outubro, no Paraná e, de maio a novembro, em São Paulo (MANTOVANI e MORELLATO 2000). O palmitreiro é considerado uma espécie importante do ecossistema, pois, além de possuir uma alta densidade de indivíduos em suas populações em ambientes naturais (MARCOS e MATOS 2003), desempenha papel fundamental na alimentação da fauna, que procura seus frutos durante os 6 meses em que estão maduros, mas se alimenta de sementes, frutos verdes e plântulas de *E. edulis* durante o resto do ano (REIS e KAGEYAMA 2000).

Para que a palmeira juçara não seja extinta e seja fonte renovável de riqueza, deve-se conhecer as orientações legais voltadas à preservação, extração e industrialização do produto e, torna-se necessário intensificar a preocupação com a reposição da espécie por meio do replantio (AMBIENTE BRASIL, 2010). O processo mais adequado para a exploração do palmitreiro é o manejo sustentável (FLORIANO *et al.* 1988), tornando-se uma nova fonte de renda das áreas florestadas (REIS, REIS e FANTINI 1993). Dessa forma, além de evitar-se o risco de extinção da espécie, em seu estado natural, protege-se a fonte de renda de famílias inteiras que se dedicam à extração de produtos da floresta (PEREIRA, 2000).

2.3. COMERCIALIZAÇÃO

A produção de frutos do açaí nordestino (*E. oleracea*) provinha quase que exclusivamente do extrativismo. Em meados da década de 1990 passou a ser obtida também de regiões com espécimes nativos manejados e de cultivos implantados. Dos frutos do açaizeiro é extraído o vinho, polpa ou simplesmente açaí. São fabricados também produtos como sorvetes, licores, doces, néctares e geléias, e também é utilizado para a extração de corantes e antocianina (EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 2005).

No cultivo comercial, o caroço corresponde a 85% do peso total, utilizado na produção de cosméticos; as fibras em móveis, placas acústicas, xaxim, compensados, indústria automobilística, entre outros. Os caroços limpos são usados na industrialização de produtos A4, como na torrefação de café, panificação, extração de óleo comestível, fitoterápicos e ração animal, além de uso na geração de vapor, carvão vegetal e adubo orgânico. A polpa representa 15% e é aproveitada,

de forma tradicional, no consumo alimentar, sorvetes e outros produtos derivados (TINOCO 2005 *apud* EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL 2011).

Na região Sul, o comércio de frutos de *E. edulis* é feito em pequena escala, geralmente por agricultores de outras culturas, como forma de complementação de renda, sobretudo no Estado de Santa Catarina (MAC FADDEN, 2005). A extração nas regiões Sudeste e Sul apresentou acentuado declive, ocorrendo atualmente em áreas de remanescentes de Mata Atlântica, sobretudo clandestinamente (PEREIRA 2000). Não há dados atualizados sobre o comércio e exploração dos frutos de *E. edulis* no Estado do Paraná. Sabe-se que grande parte do comércio é feito sobre a extração de palmito em áreas de manejo regular ou de forma ilegal, o que dificulta muito a sustentabilidade da espécie (FANTINI, RIBEIRO e GURIES 2000).

2.4. ESTUDOS DE BIOATIVIDADE COM O GÊNERO *Euterpe*

Das 730 espécies de palmeiras americanas, há evidências de que existem 106 espécies conhecidas por usos medicinais, que vão desde tratamentos de cabelo a diabetes ou leishmaniose. Algumas, como *Serenoa repens* e *Roystonea regia*, são fontes de drogas que foram aprovadas para uso medicinal. Foram relatadas as mais diversas utilidades em etnofarmacologia com o gênero *Euterpe*, sendo recente catalogados e alguns elucidados por estudos científicos (SOSNOWSKA, BALSLEV, 2009).

Em 1984, PLOTKIN E BALICK relataram o uso de diversas espécies do gênero por indígenas sul-americanos, em um levantamento etnobotânico. Para *Euterpe edulis*, descreveram que o palmito “torrado” é aplicado para aliviar picadas de escorpião, em uso conjunto com o suco da torra. A seiva do caule jovem é utilizada como um hemostático. A espécie *Euterpe oleracea* é descrita como sendo hemostática e anti-diarréica, e *Euterpe stenophyllu* é usada contra bronquite. DESMARCHELIER *et al.* 1996 relatam em estudos de etnobotânica que *Euterpe edulis* era usada para tratamento de anemias por ameríndios Ese'eja, sem efeitos tóxicos. A palmeira juçara é utilizado por comunidades do Vale da Ribeira, SP, contra dores abdominais, hemorragias e mordidas de cobra (DI STASI *et al.* 2002).

Para *Euterpe precatoria*, ROJAS *et al.* 2003 relatam o uso como tratamento para hepatite, dismenorréia e diarreias, e extratos das raízes apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e

Pseudomonas aeruginosa, com halo inibitório de 13 mm de diâmetro, enquanto DEHARO *et al.* (2004) descreve sua utilização em doenças inflamatórias pelo grupo étnico boliviano Tacana, com comprovação do efeito *in vitro* em agregação plaquetária.

As polpas de açaí (*Euterpe oleracea*) são bastante estudadas por sua capacidade antioxidante (ROGEZ, 2000 *apud* SILVA *et al.* 2007). Frações de *E. oleracea* inibem a produção de óxido nítrico, através da redução dos níveis de expressão de sintetase de ácidos nítricos (MATHEUS *et al.* 2006), e extratos apresentam efeito vasodilatador endotélio dependente em mesentério vascular de ratos, tendo a possibilidade de usá-la como uma planta no tratamento de doenças cardiovasculares (ROCHA *et al.* 2007). COÏSSON *et al.* (2005) mostram que o iogurte enriquecido com suco de açaí (10% volume) pode ser usado como um pigmento natural funcional para aromatizantes e corantes de iogurte, sendo comprovada a ausência de efeitos genotóxicos e presença de efeitos protetores contra dano ao DNA induzida por doxorubicina (DXR) (RIBEIRO *et al.* 2010). Os efeitos antioxidantes e hipocolesterolêmicos do açaí em uma dieta suplementada sugerem que o consumo aumenta a capacidade antioxidante e tem efeito hipocolesterolêmico em um modelo animal de hipercolesterolemia (SOUZA *et al.* 2010). Os flavonóides desta espécie foram avaliados pela capacidade de absorção de oxigênio radical (ORAC), proteção celular baseado em anti-oxidantes e formação de espécies de oxigênio em células polimorfonucleares, e contribuem para a redução do dano oxidativo dentro da célula (KANG *et al.* 2010). Um rico extrato de antocianinas, gerado a partir do açaí comum, demonstrou grandes propriedades antiproliferativas contra células humanas MDA-468 da cancer de mama (HOGAN *et al.* 2010), e frações monoméricas inibiram em até 95,2% a proliferação de células cancerosas do cólon, enquanto frações poliméricas induziram a inibição de 92,3% (PACHECO-PALENCIA *et al.* 2010). Outro estudo demonstrou que a polpa de açaí aumenta a viabilidade de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados e a probióta em iogurte probiótico (SANTO *et al.* 2010). A suplementação de açaí em 2% nos alimentos aumentou a vida útil das drosófilas alimentados com uma dieta rica em gordura em relação ao controle não-suplementados, através da ativação de vias de resposta ao estresse e supressão do estresse oxidativo (SUN *et al.* 2010). As polpas de açaí apresentam grande atividade inibitória para a α -amilase salivar, e atividade anti-tripsina (ARAUJO *et al.* 2004), e contra superóxido dismutase, com

comprovação de que os antioxidantes no açaí são capazes de entrar nas células humanas de uma forma totalmente funcional e para executar uma função de resfriamento de oxigênio em doses muito baixas, atuando também como potencial inibidor de ciclooxigenase COX -1 e de COX-2. Ele também mostrou não ter efeito sobre a proliferação de linfócitos e capacidade fagocítica (SCHAUSS *et al.* 2006A). Um suplemento nutricional industrializado de polpa de *E. oleracea* com acréscimo de outros componentes (MonaVieActive[®]) mostrou ter ausência de efeitos mutagênicos, clastogênicos, citotóxicos ou genotóxicos em ratos (SCHAUSS *et al.* 2010).

2.5. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um grupo fenol – um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Este é um grupo quimicamente heterogêneo de metabólitos vegetais secundários com aproximadamente 10.000 compostos. Apesar dos metabólitos secundários não serem imprescindíveis ao desenvolvimento das plantas, muitas vezes contribuem para o valor adaptativo das mesmas, nas relações planta-planta, planta-animal, planta-microrganismo. Isto acontece porque geralmente os metabólitos secundários são bioativos, inibindo herbivoria, atraindo animais dispersores de sementes, protegendo contra a radiação ultravioleta, entre outras funções (CUSHNIE e LAMB, 2005). Por ser uma classe muito grande e diversificada de compostos químicos, os fenólicos vegetais são divididos em outras classes menores. Entre elas podem-se citar os ácidos fenólicos, os flavonóides, os taninos, entre outros.

Os flavonóides são compostos polifenólicos naturais largamente distribuídos nos vegetais superiores (angiospermas), principalmente. Eles são encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, caules e flores, bem como chá, vinho, própolis e mel (CUSHNIE e LAMB, 2005), e representam um constituinte comum da dieta humana. São várias as funções destes compostos na natureza: compostos antimicrobianos, fornecer cores atraentes para os polinizadores vegetais, proteção contra fungos patogênicos e radiação UV-B, transferência energética, fotossensibilização, ações de hormônios de crescimento, controle da respiração e fotossíntese, morfogênese e determinação do sexo (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER 1997; CUSHNIE e LAMB, 2005). Muitos deles apresentam atividade biológica como,

por exemplo, podem-se citar as atividades antioxidantes, antiinflamatória, antibacteriana e tanante que tem um grande potencial de exploração na área cosmética (PERRUCHON, 2002). Produtos cosméticos contendo 1% de flavonóides em peso já apresentam atividade microbicida e, além disso, são hidrossolúveis e não causam irritação cutânea o que facilita sua aplicação cosmética (ROCHA, 1994). GRANGE e DAVEY (1990) e CUSHNIE e LAMB (2005) mencionaram a forte ligação entre a concentração de flavonóides e a atividade antimicrobiana que os mesmos apresentam. Os flavonóides possuem estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6, com um anel de cromano ostentando um segundo anel aromático na posição 2, 3 ou 4, e são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano (FIGURA 3). As principais categorias estruturais gerais são as flavonas, as flavanonas, os flavonóis, as antocianinas e as isoflavonas (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER 1997; MARÇO *et al.*2008).

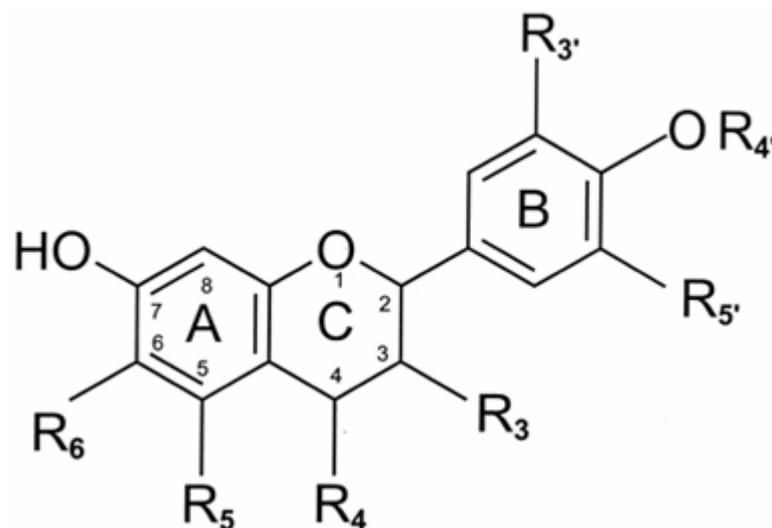


FIGURA 03 – Estrutura química de flavonóide. Fonte: PATEL, 2008.

A atividade farmacológica dos flavonóides está sendo cada vez mais documentada. Têm sido relatadas muitas propriedades úteis, incluindo a atividade anti-inflamatória, atividade estrogênica, inibição enzimática, atividade antimicrobiana, atividades antialérgicas, atividade antioxidante, atividades vasculares, atividade citotóxica e antitumoral. Tem sido demonstrado que flavonóides têm efeitos sobre as diversas fases de transdução de sinal, influenciando os mecanismos acionados por citocinas, fatores de crescimento, ou hormônios, o que leva a alterações na expressão de genes. Também foi demonstrado que estão envolvidos com atividade

protetora em arteriosclerose, doenças cardiovasculares e artrite (SOVAK 2001; BAYDAR *et al.* 2004; LARKINS e WYNN, 2004). As propriedades antimicrobianas da própolis têm sido atribuídas ao seu alto conteúdo flavonóide (CUSHNIE e LAMB 2005). Alguns componentes presentes no extrato da própolis, como flavonóides (quercetina, galangina, pinocembrina) e ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico, provavelmente atuam sobre membrana celular e a parede das bactérias, causando danos estruturais e funcionais, com possibilidade de efeitos sinérgicos com outros antimicrobianos (SCAZZOCCHIO *et al.* 2006). Extratos de “cloudberry”, framboesa e morango foram potentes inibidores da *Salmonella* sp. Estas propriedades podem ser utilizadas em alimentos funcionais e como conservantes alimentares (PUUPPONEN-PIMIA *et al.* 2001). Alguns pesquisadores têm relatado sinergia entre flavonóides e outros agentes antibacterianos contra cepas resistentes de bactérias. Exemplos destes incluem epicatequina-galato e soforaflavanona G, e grupos de estudo querem isolar e identificar a estrutura de flavonóides que possuem atividade antibacteriana. As duas classes de flavonóides consideradas como mais importantes para ações farmacológicas são os flavonóis e as antocianidinas (CUSHNIE e LAMB 2005).

2.6. ANÁLISES QUÍMICAS E NUTRICIONAIS NO GÊNERO *Euterpe* sp.

Os frutos de diversas espécies de palmeiras apresentam antocianinas e outros compostos bioativos de interesse. Dentre estas espécies, as da família Arecaceae (Palmae), gênero *Euterpe* possuem uma quantidade notável. Alguns estudos sobre a composição fitoquímica de frutos de espécies do gênero *Euterpe* já foram realizados, mas utilizando as espécies mais popularmente utilizadas, como o açai (*Euterpe oleracea*) e a palmeira precatória (*Euterpe precatoria*).

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, e são os pigmentos entre os mais importantes e amplamente consumidos em alimentos naturais, e que atraíram maior atenção como corantes alimentares naturais e potentes agentes bioativos. As antocianinas possuem uma ou mais hidroxilas ligadas a açúcares, sendo os mais comuns glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, como *p*-coumárico, caféico, fenílico e vanílico. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes

pigmentos, quando comparados com as antocianidinas (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER 1997; MARÇO *et al.* 2008).

A identificação e quantificação de antocianinas em frutos da palmeira juçara foram determinados por HPLC-MS/MS, onde apresentou cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (ROSSO *et al.* 2008). Compostos menores foram identificados como cianidina-3-sambubiosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-rutinosídeo. O teor de antocianinas em material fresco foi calculado com base na alteração da massa medida durante liofilização, onde foi mensurado 290 mg de antocianinas / 100 g de peso fresco (DE BRITO *et al.* 2007). BOBBIO *et al.* 2000 afirmam que as antocianinas identificadas em *E. oleracea* são cianidina-3- arabinosídeo e cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo, e o teor de antocianinas totais no caso do fruto do açazeiro foi determinado e o valor encontrado foi de 263 mg / 100g casca. A fluorescência e absorção do espectro do açaí são semelhantes aos da clorofila (PEREIRA *et al.* 2010). Conforme PACHECO-PALENCIA *et al.* 2009, as antocianinas foram os polifenóis predominantes em *E. oleracea* (2247 ± 23 mg / kg) e *E. precatoria* (3458 ± 16 mg / kg), e várias flavonas, incluindo homoorientina, orientina, deoxyhexose taxifolina e isovitexina; vários derivados de flavonóides, incluindo (+)-catequina, epicatequina, dímeros e trímeros procianidina e ácidos fenólicos, incluindo ácidos protocatecuico, p-hidroxibenzóico, vanílico, ferúlico e siríngico , também estiveram presentes em ambas as espécies. A estabilidade térmica desses compostos foram avaliados, com resultado em 80 ° C por até 60 min, na presença e na ausência de oxigênio, o que indica estabilidade moderada (PACHECO-PALENCIA *et al.* 2009). A degradação das antocianinas foi calculada com meia-vida entre 9,4 e 43 dias para a cianidina-3-glicosídeo, e de 18 a 82 dias para a cianidina-3 rutinosídeo. A fortificação com ácido ascórbico acelera a degradação das antocianinas no suco clarificado sob refrigeração, provavelmente devido à perda de formas de antocianinas poliméricas (21%) (PACHECO-PALENCIA *et al.* 2007). O tratamento de pasteurização a 82,5° C / 1 min em pH 3,75 determinou as menores perdas de antocianinas (<15%), sendo considerado por ROGEZ (2000) um tratamento adequado (SCHULTZ 2008). A pasteurização em condições ácidas (82,5° C / 1min pH 3,75) inativa tanto a peroxidase quanto a polifenoloxidase de açaí (ROGEZ 2000 *apud* SCHULTZ 2008).

Na polpa de *Euterpe oleracea*, foram encontrados fitoesteróis, com presença de brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -Sitosterol + sitostanol, $\Delta 5$ -

Avenasterol + $\Delta 7$ -stigmasterol e $\Delta 7$ -avenasterol. Em relação a tocoferóis, foi mensurado vitamina E na forma de α -Tocoferol (COSTA *et al.* 2010). O total de ácidos graxos poliinsaturados, o total de ácidos graxos monoinsaturados, e o total de ácidos graxos saturados contribuíram para 11,1%, 60,2% e 28,7% do total de ácidos graxos. Ácido oléico (53,9%) e ácido palmítico (26,7%) foram os dois ácidos graxos dominantes (SCHAUSS *et al.* 2006B). Contudo, as altas quantidades de ácidos graxos mono e poliinsaturados contribuem para uma rápida oxidação e rancificação da bebida (ROGEZ, 2000 *apud* SCHULTZ 2008). NAZARÉ *et al.* (2002), estudando entre outros o corante de açaí, afirmam tratar-se de duas antocianinas que apresenta lenta degradação quando submetido à ação da luz solar e da luz artificial.

Para palmeira precatória (*E. precatória*) foi feito um levantamento dos constituintes químicos a partir dos extratos hexânicos, em acetato de etila e metanólicos da raiz e extratos hexânicos e em acetato de etila do talo das folhas, encontrando β -sitosterol, estigmasterol e ácido p-hidroxi-benzóico, além de α -e β -amirina e lupeol e diversos compostos de interesse antitumoral, anti-malária e pesticida (GALOTTA *et al.* 2005).

A análise do óleo bruto do fruto do açaí comum (*E. oleracea*) mostra que foram isolados ácidos fenólicos como o ácido vanílico ($1,616 \pm 94$ mg/kg), ácido siríngico ($1,073 \pm 62$ mg / kg), ácido p-hidroxibenzóico (892 ± 52 mg / kg), ácido protocatecuíco (630 ± 36 mg / kg) e ácido ferúlico ($101 \pm 5,9$ mg / kg), apresentando-se como uma alternativa promissora aos tradicionais óleos para a alimentação, suplementos e aplicações cosméticas (PACHECO-PALENCIA *et al.* 2008). Extratos metanólicos e etanólicos das sementes desta espécie mostram boa capacidade antioxidante contra os radicais peroxil, similar à capacidade da polpa, e a capacidade antioxidante contra os radicais hidroxila e peroxinitrito é ainda maior (RODRIGUES *et al.* 2006).

O suco produzido dos frutos de *Euterpe edulis* apresenta maiores quantidades de compostos fenólicos, antocianinas e maior atividade antioxidante do que o açaí de *Euterpe oleracea* (SCHULTZ 2008). O açaí é uma bebida pouco ácida, com pH médio de 5,23. É um alimento com alto percentual de lipídeos, os quais representam em média 52,64% da matéria seca da bebida. Os lipídeos fornecem cerca de 90% das calorias contidas (SCHULTZ 2008). O suco produzido dos frutos de *E. edulis* apresentou 81% mais compostos fenólicos e 353% mais antocianinas do que o açaí de *E. oleracea*, o que confirma os resultados de

IADEROZA (1992), que encontrou maiores quantidades de antocianinas em frutos de *E. edulis* do que em *E. oleracea* (SCHULTZ 2008). Em comunicado técnico por FIGUEREDO *et al.* (2008), estudos com extrato hidroalcoólico acidificado de *Euterpe edulis* apresentaram características similares ao extrato dos frutos do açaí, com intensa coloração púrpura, e com evidente estabilidade do extrato às diferentes temperaturas. Obteve-se um volume de sólidos totais igual a 1,13%. Verificou-se a presença de flavonol ou diidroflavonol, de fenóis no concentrado e de diversas antocianinas. Também apresenta $186 \pm 43,3$ mg / 100 g de Vitamina C, $375 \pm 87,6$ mg / 100 g de flavonóides amarelos, $1,9 \pm 0,5$ mg / 100 g de carotenóides totais e $21,5 \pm 4,1$ mg / 100 g de clorofila.

Os ácidos fenólicos e flavonóides presentes no juçara (*Euterpe edulis*) são semelhantes aos os de açaí (*Euterpe oleracea*). Quatro ácidos fenólicos (ferúlico, gálico, protocatecuico, e *p*-cumárico) e três flavonóides (catequina, epicatequina e quercetina) foram encontrados. No entanto, as concentrações desses compostos são declaradamente superiores, respectivamente, nas espécies *E. edulis*, *E. precatoria* e *E. oleracea* (BORGES *et al.* 2010).

2.7. FUNGOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas habitando, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros, e ao colonizar superfícies são denominados fungos epifíticos. Eles distinguem-se dos patógenos, que causam doenças nas plantas. De modo geral, a divisão entre estas classificações é tênue, e inclui todo o espectro de interações simbióticas em que os fungos e as plantas participam: parasitismo, comensalismo e mutualismo (STONE *et al.* 2004; AZEVEDO 1999).

Os endófitos podem proporcionar aos seus hospedeiros uma série de benefícios, tais como proteção contra herbivoria e patógenos. Fungos endófitos podem sobreviver em uma planta como um simbiote fornecendo substâncias de proteção (por exemplo, antibacterianos), que podem inibir a invasão dos tecidos por patógenos, enquanto a planta também fornece nutrientes para o fungo (XU *et al.* 2009). Apesar da maior parte das plantas terem desenvolvido uma variedade de mecanismos de resistência que evita a infecção pela maioria dos oportunistas,

fungos simbióticos evoluíram com seus hospedeiros e adaptaram-se a eles. Um fungo endofítico, por exemplo, pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um micro-organismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por certo período, causando ou não danos à mesma (STONE *et al.* 2004).

Microrganismos associados a plantas na natureza, em especial fungos e bactérias, tem sido reconhecidos como ricas fontes de compostos novos, como fitotóxicos e reguladores do crescimento vegetal. A fim de explorar de forma eficiente seu nicho ecológico, um endófito de plantas precisa ultrapassar as barreiras físicas e químicas de seu hospedeiro (HUSSAIN *et al.* 2007). Produtos de valor econômico, como fármacos, incluindo aí novos antimicrobianos e produtos anti-cancerígenos, têm sido descobertos a partir de fungos endofíticos. Um dos casos mais interessantes é o da produção de taxol, um diterpenóide utilizado contra certos tipos de câncer e que além de ser produzido por alguns vegetais, como *Taxus brevifolia*, também o é, por fungos que habitam esta planta, como o *Taxomyces andreanae*, o que potencialmente permite a produção do fármaco pelo fungo, por fermentação industrial, protegendo desta maneira a planta, que possui crescimento lento, de possível risco de extinção (STONE *et al.* 2004; AZEVEDO 1999). Os papéis de fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras durante a acumulação de metabólitos secundários são ainda mais diversos. Tem sido reconhecido que os resultados das interações micro-organismo / hospedeiro podem ser influenciados pela diversidade genética de simbiontes, as maneiras pelas quais eles são adquiridos do ambiente, sua capacidade de co-colonizar, suas interações diretas e indiretas, e sua história evolutiva própria (ARNOLD 2007). O reconhecimento de influências ambientais na formação do produto natural é bem ilustrado pelas condições de cultura usadas para produção de metabólitos em ambientes industriais, onde bem sabe-se que fontes de carbono e nitrogênio, luz, temperatura e pH muito afetam a produção de metabólitos. (HOFFMEISTER e KELLERB 2006).

Não há indicativos de estudos mais aprofundados com fungos endófitos em *Euterpe edulis*, e dentro do gênero botânico são escassos, assim como pesquisas com potencial biotecnológico dos mesmos.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Investigar o potencial antimicrobiano dos frutos e das sementes de *Euterpe edulis*.

3.2. ESPECÍFICOS

1. Determinar umidade, sólidos totais, lipídeos, proteínas, resíduo mineral fixo (cinzas) e sais minerais da polpa, da casca das sementes e das sementes dos frutos de *E. edulis*

2. Otimizar métodos de obtenção de extrato hidroetanólico dos frutos e procedimentos para extração de óleos das sementes de *Euterpe edulis*.

3. Verificar a ação inibitória do extrato e do óleo de *E. edulis* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.

4. Isolar fungos epifíticos e endofíticos dos frutos e sementes de *E. edulis*.

5. Verificar se os fungos isolados apresentam ação inibitória contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Staphylococcus aureus* metilcilina aminoglicosídeo resistente (MRSA).

6. Determinar se os fungos testados apresentam diferenças em sua ação antimicrobiana quando cultivados em meio BDA e meio Sabouraud.

7. Pesquisar se há alterações na ação antimicrobiana dos fungos testados em condições de crescimento diferenciado, por adição do extrato hidroetanólico dos frutos ao meio de cultura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA DOS FRUTOS DE *Euterpe edulis*

As amostras para preparação dos extratos foram coletadas pelos pesquisadores da Embrapa Florestas, na região da Serra do Mar Paranaense, nos municípios de Antonina e Morretes, região de clima tropical úmido ou superúmido, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger (EMBRAPA, s/n). Foram realizadas 3 colheitas, nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2009., resultando em aproximadamente 20 kg. A colheita foi realizada numa mesma área, para não haver diferenças eventuais na composição química dos frutos. Os frutos foram separados dos galhos e partes sem interesse, selecionados (só sendo aceitos os frutos perfeitos em estágio máximo de maturação, de cor arroxeadas a negras), lavados e foram mantidos sob refrigeração a 4°C, até a sua manipulação.

4.2. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Para o teste de atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, MRSA (*S. aureus* metilcilina aminoglicosídeo resistente), e inóculos de *Candida albicans* ATCC 10231. As cepas foram adquiridas junto ao banco de cepas do LABMICRO (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular), do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, e conservadas sob refrigeração a $\pm 4^\circ \text{C}$.

4.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS E SEMENTES

As análises de umidade, teor de sólidos solúveis totais, proteínas, cinzas, fibras, sais minerais e lipídeos foram realizadas em conjunto com a Embrapa Florestas, baseados em métodos utilizados por INSTITUTO ADOLFO LUTZ 2005.

4.3.1. Determinação de umidade

A umidade foi calculada pelo método de secagem em estufa a temperatura de 102° C, em triplicata, até peso constante da amostra. O cálculo em porcentagem encontra-se nos Apêndices.

4.3.2. Determinação de sólidos solúveis totais

A determinação dos sólidos solúveis totais foi subtraída dos 100% da umidade correspondente.

4.3.3. Quantificação de lipídeos

A fração lipídica foi feita por extração a quente em extrator de Soxhlet, usando como solvente éter etílico. O teor foi calculado como o peso do balão utilizado após a evaporação do solvente, menos o peso do balão seco.

4.3.4. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi feita por digestão ácida de matéria orgânica, seguida de destilação, e titulação do nitrogênio residual. O valor obtido é multiplicado pelo fator 6,25.

4.3.5. Quantificação de resíduo mineral fixo (cinzas)

A quantificação de cinzas foi feita pela perda de peso da amostra após incineração a 550° C.

4.3.6. Determinação de sais minerais

As concentrações de sais minerais foram determinadas através do protocolo INSTITUTO ADOLFO LUTZ 2005.

4.4. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DOS FRUTOS

Os frutos de *E. edulis* foram submetidos ao processo de extração conforme método adaptado de NAZARÉ *et al.* (2002): os frutos foram macerados a frio, em proporção 1:2, por 48 horas em ausência de luz, em solvente constituído por álcool etílico 70%, acidificado com ácido clorídrico até atingir pH 3,0, sendo homogeneizado a cada 6 horas. Após esse período, o material foi peneirado, filtrado a vácuo e concentrado em evaporador rotativo, a 75° C no máximo, sendo depois secado em dessecador, até tornar-se um pó de coloração escura. O pH foi medido durante todo o processo de concentração, sendo ao final a medição em aproximadamente pH 6,5. Após esta etapa, foi feito teste antimicrobiano com este extrato. O método de escolha foi o de macrodiluição em caldo e macrodiluição em ágar (OKEKE *et al.* 2001, PRETTO 2005).

Foram realizadas também extrações com diversos solventes. Os frutos foram macerados a frio em solvente, em proporção 1:2, por 48 horas em ausência de luz, sendo homogeneizado a cada 6 horas. Após esse período, o material foi peneirado, filtrado a vácuo e concentrado em evaporador rotativo, a 75° C no máximo, sendo depois deixado evaporar o solvente a temperatura ambiente e em dessecador por 48 horas. Foram utilizados como solventes água miliQ, clorofórmio, éter etílico, hexano, acetato de etila, álcool isopropílico, metanol, diclorometano e acetona.

4.5. MACRODILUIÇÃO EM CALDO E ÁGAR (OKEKE *et al.* 2001, PRETTO 2005)

Cada cepa bacteriana de interesse foi inoculada previamente em placas contendo meio Mueller Hinton (MH), incubadas por 24 horas a 35° C (DEUSCHLE *et al.* 2007) (exceto para *Candida albicans* testada em meio Sabouraud), utilizando alça flambada, pelo método de esgotamento. O inóculo foi obtido após o período de incubação, em que foram selecionadas 3 a 4 colônias, transferidas para um tubo esterilizado contendo 5 mL de solução salina (0,86%) (item 4.3.1), de forma que a turbidez da suspensão foi semelhante ao padrão nº 5 da escala de Mc Farland (1×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) / mL) (OKEKE *et al.* 2001 e PRETTO 2005).

O teste foi preparado da seguinte forma: o extrato foi diluído em etapas seriadas, indo desde 10 mg / mL a 0,625 mg / mL, utilizada na diluição água destilada esterilizada (FIGURA 04). A seguir, 1,9 mL de caldo ou ágar MH foram acrescentados e homogeneizados ao extrato com auxílio de micropipeta esterilizada. Os meios então foram inoculados com 100 µL de suspensão com as cepas de interesse. Tubos sem extrato (controle negativo) e com antimicrobiano apropriado (controle positivo) também foram preparados nas mesmas baterias de teste. O mesmo método foi repetido para *Candida albicans*, utilizando-se de caldo e ágar Sabouraud.



FIGURA 04 – Aspecto da macrodiluição em concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL, controle negativo e controle positivo. Fonte: Autor, 2010.

Os resultados dos testes foram avaliados 24 horas após o período de incubação em estufa a 35° C. Foi considerado positivo para ação antimicrobiana aquele que apresentou inibição parcial ou total do crescimento dos patógenos. Para que o teste fosse considerado válido, foi necessário crescimento (turbidez definitiva ou presença detectável de colônia) no controle negativo (contendo apenas caldo ou ágar MH). O controle positivo do potencial antimicrobiano foi feito com gentamicina 0,2 µg / mL para bactérias e nistatina 100.000 UI (Unidades Internacionais) / mL para *Candida albicans*. O método foi adaptado de OKEKE *et al.* 2001 e PRETTO 2005. Cada bateria de teste foi repetida 5 vezes.

4.6. ÓLEOS DAS SEMENTES

As sementes com casca, separadas da polpa, foram lavadas com água destilada, secas em estufa a 100° C, moídas em moinho automático, e a farinha obtida foi utilizada em extração a quente em Soxhlet e a frio em maceração, pelo protocolo INSTITUTO ADOLFO LUTZ 2005.

A extração a quente foi realizada em extrator de Soxhlet, sendo utilizado como solvente éter etílico. Após 24 horas de extração, o produto foi levado à estufa a 35° C para evaporação do éter excedente, e o produto final foi avaliado em relação ao seu aspecto e rendimento.

A extração a frio foi feita diretamente em imersão, na proporção de 1 parte de farinha de sementes para 2 de solvente, também tendo como solvente o éter etílico. Após 48 horas de imersão, com agitação manual suave a cada 8 horas, o produto foi filtrado em funil de vidro e gaze esterilizada, e o éter excedente foi deixado a evaporar naturalmente. O produto final foi avaliado em relação ao seu aspecto e rendimento após, aproximadamente, 48 horas.

Os óleos foram testados pelo método de perfuração em ágar (OKEKE *et al.* 2001, OSTROSKY *et al.* 2008).

4.7. ISOLAMENTO FÚNGICO

Para isolamento dos fungos epifíticos e endofíticos, foi seguida a metodologia de STONE *et al.* 2004 e AZEVEDO 1999, adaptada. Todos os frutos foram lavados em água destilada esterilizada. A seguir 16 frutos foram selecionados aleatoriamente. Foram cortadas 3 fragmentos de aproximadamente 5 mm² da polpa por fruto, utilizando bisturi esterilizado. Com uma pinça esterilizada, as lascas foram cuidadosamente colocadas sobre meio BDA, e incubados a 28° C em BOD. O acompanhamento do crescimento dos fungos passou a ser feito após 48 horas. Estes fungos foram denominados fungos AFS (“açaí fruto sujo”), por se tratar de epifíticos.

O isolamento dos fungos endofíticos foi realizado, onde 12 frutos foram desinfetados pela imersão em hipoclorito de sódio 3%, etanol 90%, etanol 70%, e logo depois em água destilada duas vezes, cada um por 5 minutos. Cada placa de Petri contendo meio BDA recebeu 3 fragmentos de aproximadamente 5 mm²

retirados da polpa dos frutos, cortados em condição asséptica, ou o fruto foi inoculado inteiro na superfície do meio. A estes frutos foi atribuída a sigla AFL (“açai fruto limpo”), e foram incubados a 28° C em BOD. O crescimento dos fungos passou a ser acompanhado após 48 horas.

Para isolar fungos endofíticos das sementes, a polpa de 10 frutos foi separada da semente. Esta foi quebrada com martelo esterilizado e 3 fragmentos de aproximadamente 5 mm² foram colocados sobre o meio BDA, e incubados a 28° C em BOD. O acompanhamento do crescimento dos fungos passou a ser feito após 48 horas. Os fungos foram denominados AFL-semente (“açai fruto limpo – semente”).

As colônias fúngicas que se apresentavam distintas umas das outras, de acordo com observações macroscópicas (coloração e características de crescimento das colônias em meio de cultura), foram repicadas sucessivamente em meio BDA e armazenadas a ± 4 °C.

A identificação foi feita através de observação macroscópica e microcultivo em blocos de meio BDA. Para este procedimento foram utilizadas placas de Petri esterilizadas contendo no seu interior duas lâminas cruzadas e um chumaço de algodão. O meio BDA foi cortado com bisturi esterilizado, formando cubos de 1 cm³. Foi retirado um cubo e colocou-se sobre as lâminas. Pequenas quantidades de micélio do isolado endofítico ou epifítico foi retirado do tubo estoque e colocados sobre as extremidades do cubo. Com auxílio da pinça esterilizada colocou-se cuidadosamente a lamínula sobre o cubo. O algodão foi umedecido com água destilada esterilizada com o auxílio de pipeta. Incubou-se na estufa a 28° C. A lamínula foi retirada em intervalos de tempos diferentes (7, 14 e 21 dias) e colocada sobre uma lâmina limpa com uma gota de lactofenol azul de algodão ou lactofenol incolor, sendo observada ao microscópio óptico (KERN e BLEVINS, 1999). Para a identificação, usou-se como referência HOOG *et al.* 2004.

4.8. TESTE ANTIMICROBIANO POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR (OKEKE *et al.* 2001, OSTROSKY *et al.* 2008)

Após a identificação por microcultivo dos gêneros fúngicos endofíticos e epifíticos, foi realizado teste antimicrobiano com 7 fungos isolados dos frutos desinfectados (AFL), 7 fungos isolados dos frutos não desinfectados (AFS) e 1 fungo isolado das sementes dos frutos desinfectados (AFL-semente), em meio BDA e

Sabouraud, para verificar se a diferença dos meios influenciaria a possível ação antimicrobiana, totalizando 15 gêneros. O método de escolha foi o de perfuração em ágar, ou método de poços ("well-plate"). Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de perfurador de rolha de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação dos fungos a serem analisados (OKEKE *et al.* 2001, OSTROSKY *et al.* 2008).

Para este teste, as cepas bacterianas de interesse (item 4.2) foram inoculadas previamente em cultivos em placas contendo meio Mueller Hinton, incubadas por 24 horas a 35° C (DEUSCHLE *et al.* 2007). O inóculo foi obtido após o período de incubação, em que se selecionou 3 a 4 colônias, transferindo-as para um tubo contendo 5 mL de solução salina esterilizada, de forma que a turbidez da suspensão foi semelhante ao padrão nº 5 da Mc Farland, que equivale a turbidez de 1×10^8 UFC / mL. Depois, 0,1 mL desta suspensão foram adicionados a 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,8% esterilizada, obtendo 1×10^7 UFC / mL, exceto para *Candida albicans*, em que foi usada a solução 1×10^8 UFC / mL. Para o teste de atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, além de inóculos de *Candida albicans* ATCC 10231 e MRSA (*S. aureus* metilcilina aminoglicosídeo resistente).

Meio MH foi perfurado seis vezes com perfurador de rolha esterilizado, de 6mm de diâmetro. Depois o meio foi retirado cuidadosamente dos poços, procurando manter íntegra a borda. A suspensão de cepas 1×10^7 UFC / mL (para *C. albicans* 1×10^8 UFC / mL) foi então inoculada com *swab* esterilizado, sobre a superfície do meio, de modo a cobrir toda a superfície do meio. A seguir, os meios retirados com micélio, previamente preparados, foram retirados e colocados dentro dos poços. Meio BDA ou Sabouraud foi utilizado como controle negativo, e o controle positivo do potencial antimicrobiano foi feito com gentamicina 0,2 µg / mL, vancomicina 0,2 µg / mL para MRSA e nistatina 100.000 UI / mL para *Candida albicans*. Os testes foram feitos em triplicata. Após 24 horas, observou-se a formação ou não de halos de inibição de crescimento e o diâmetro destes foi medido em milímetros. Foi considerado ativo o fungo que levou à produção de halo (OKEKE *et al.* 2001, OSTROSKY *et al.* 2008)

4.9. MEIO MODIFICADO COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO DOS FRUTOS

Após os testes com os fungos, percebeu-se que 8 isolados apresentaram atividade antimicrobiana. Estes fungos isolados foram, então, testados em meios BDA ou Sabouraud modificados pela adição de extrato dos frutos de *E. edulis*, de modo a avaliar se havia diferença (acréscimo ou ausência) em sua atividade antimicrobiana.

Meio BDA ou Sabouraud foram preparados da mesma forma que a descrita nos itens 4.3.2 e 4.3.4, exceto pela concentração em dobro de ágar (item 4.3.5 e 4.3.6). O meio foi esterilizado, e adicionado em proporção de 1:1 a 10 mL de extrato hidroalcólico dos frutos, previamente mantido sobre placas esterilizadas por 1 hora sob luz UV de comprimento de onda de 375 nm, para descontaminação. Homogeneizou-se a mistura, obtendo um meio de cor púrpura muito escura. Os fungos foram então inoculados neste meio, e utilizados em teste de perfuração em ágar conforme descrito no item 4.9. O conceito desta metodologia foi manter os mesmos padrões de açúcares que os meios anteriores, mas acrescentando a maior quantidade possível de extrato sem perder as características de solidez do ágar ou alterações significativas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS E SEMENTES

Os resultados da composição química dos frutos, das cascas das sementes e das sementes de *E. edulis* estão apresentados nos QUADROS 01 e 02.

QUADRO 01 - Composição nutricional dos frutos da palmeira juçara.

COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL				
	POLPA	CASCA SEMENTE	SEMENTE	TOTAL
Umidade (g / 100g)	97,93	5,48	1,48	104,89
Sólidos solúveis totais (g / 100g)	2,07	94,54	98,52	195,13
Lipídeos (g / 100g)	0,58	28,87	0,58	30,03
Carboidratos totais (g / 100g)	≤ 0,5	63,90	91,90	155,8
Cinzas (g / 100g)	0,22	1,57	1,50	3,29
Proteínas (g / 100g)	1,27	0,20	4,54	6,01

Fonte: Autor e Embrapa florestas, 2010.

QUADRO 02 - Sais minerais dos frutos da palmeira juçara.

SAIS MINERAIS				
	POLPA	CASCA SEMENTE	SEMENTE	TOTAL
Cu (mg / 100g)	0,03	0,65	0,40	1,08
Zn (mg / 100g)	0,25	1,64	0,62	2,51
Fe (mg / 100g)	1,39	9,60	13,19	24,18
Mn (mg / 100g)	0,26	3,89	1,83	5,98
Ca (mg / 100g)	16,88	303,54	274,52	594,94
Mg (mg / 100g)	5,25	49,67	41,87	96,79
K (mg / 100g)	5,51	35,97	93,26	134,74
P (mg / 100g)	131,88	259,90	764,90	1156,68
S (mg / 100g)	8,82	73,16	97,18	179,16
Na (mg / 100g)	3,00	1,36	5,91	10,27

Fonte: Autor e Embrapa florestas, 2010.

Pode-se observar que na polpa, a umidade é o fator mais relevante (97,93g / 100g) (Quadro 2). Na casca da semente, há grande teor de sólidos totais (94,544g / 100g), e enorme quantidade de carboidratos totais (63,90g / 100g) (Quadro 2). Na

semente, é importante o teor de sólidos totais (98,52g / 100g), seguido pelo teor de carboidratos totais (91,90g / 100g).

A umidade foi muito maior que a encontrada por BORGES *et al.* 2010 em *E. edulis*, que variou entre 34,95% a 42,47%. A proteína bruta encontrada por estes Autores variou entre 5,13 e 8,21 %, e a média das amostras analisadas por estes Autores (6,06g / 100g) está dentro do descrito em literatura (BORGES *et al.* 2010). A quantidade de proteínas mensuradas por BORGES *et al.* 2010 é duas a três vezes abaixo do que para *E. oleracea* (13,8 – 15,9%), mas consistente com o encontrado para palmeira juçara crescida no Norte do Brasil (6,72%) (SILVA *et al.* 2004 *apud* BORGES *et al.* 2010). Os lipídeos ficaram muitíssimo abaixo do descrito (0,58g / 100g), relacionando entre 18,45 a 44,05%, encontrados por BORGES *et al.* 2010.

BORGES *et al.* 2010 comentam em seu estudo que o local de crescimento pode alterar o composição química dos frutos de juçara, e a variação no conteúdo e na composição dos compostos fenólicos nas amostras em comparação pode ser dependente do crescimento, da região e das condições climáticas. Os dados do presente estudo podem corroborar esta afirmação, se relacionados ao teor de umidade e lipídeos. A composição química, teor de compostos bioativos, perfil de ácidos graxos e antioxidantes de frutos de juçara apresentaram variações de acordo com a região de cultivo dentro do próprio estudo por BORGES *et al.* 2010. Os frutos cultivados em regiões onde o período de colheita é no verão têm um teor de compostos fenólicos, conteúdo de antocianinas e atividade antioxidante superiores aos dos frutos coletados no inverno. A região de crescimento influencia os compostos fenólicos que, conseqüentemente, influenciam a atividade antioxidante. No presente trabalho, não foi feita comparação entre os teores em diversas estações. As coletas foram feitas no verão (outubro, novembro e dezembro de 2009), em região super úmida. Isso pode levar a influências sobre os teores de umidade, mas não sobre os lipídeos (PANZA *et al.* 2009). Pode-se especular que este fator seja um diferencial interessante na comercialização do juçara, pois o valor calórico deste é menor do que o açaí, embora suas propriedades sejam muito parecidas. O perfil de ácidos graxos de juçara mostra um predomínio de ácidos graxos monoinsaturados variando de 45,53 a 56,82%, principalmente o ácido oléico (44,63-55,61%). Ácidos graxos saturados representam 24,32-28,89% do teor de lipídios totais, com o principal constituinte sendo ácido palmítico (20,25 a 25%) (BORGES *et al.* 2010). Os ácidos graxos insaturados representam cerca de 70%

dos lipídios totais, principalmente o ácido linolênico (18,19-25,36%) e ácido α -linolênico (BORGES *et al.* 2010). Alguns óleos obtidos de frutos de palmeiras têm sido testados quanto à atividade antimicrobiana e outras atividades farmacológicas (ESQUENAZI *et al.* 2002). Por isso, no estudo realizado também foi feito teste antimicrobiano com óleos obtidos das sementes de *E. Edulis*.

Os resultados do perfil de minerais pode ser observado no Quadro 02. Nas análises, a quantidade de cálcio foi bastante significativa, tendo na casca da semente com 303,54mg / 100g , seguida pelo índice de fósforo, de 764,90mg / 100g na semente. MENEZES, TORRES E SRUR (2008) analisaram polpas de *E. oleracea* liofilizadas, onde Potássio (900 mg / 100 g) e Cálcio (330 mg / 100 g) foram os minerais observados em maior abundância. Em comparação com o presente estudo, apenas o Fósforo (131,88 mg na polpa, comparado a 54,5mg) foi acima do encontrado. Entretanto, pela polpa ter sido adquirida em estabelecimento comercial, não se sabe se a casca da semente e a semente foram processadas em conjunto, o que pode levar a falsos índices.

Dentre os sais minerais encontrados na casca e na semente, a análise mostra fatores interessantes, que podem ser explorados em suplementação nutricional, através de farinhas ou refino comercial. O consumo da polpa, rica em lipídeos essenciais e de boa qualidade nutricional, e em certos minerais como o cálcio e o potássio pode contribuir na alimentação, uma vez que esses nutrientes participam de varias reações metabólicas importantes no organismo. Estes dados reforçam as possibilidades de comercialização dos frutos de *E. edulis* como alternativa ao açaí nordestino.

As sementes apresentaram grande quantidade de carboidratos totais e de cálcio, acima do encontrado na polpa (63,90g e 274,52g respectivamente). Uma análise futura poderá mostrar se são fibras insolúveis ou não. O uso de fibras em suplementação alimentar, indústria cosmética e química é enorme, e não há atualmente pesquisas sobre este substrato. Com relação às sementes, apenas PANZA *et al.* 2009 realizaram estudos da composição bioquímica, mas com ênfase na embriogênese da planta. Nota-se que o valor de lipídeos na polpa e nas sementes é idêntico, mas na casca da semente o valor é bem maior. RODRIGUES *et al.* 2006 não comentam se houve separação entre a casca e o endosperma do açaí, o que pode levar a considerar que os lipídeos estejam em alta concentração no

todo, resultando em um falso índice. Análises mais detalhadas estão previstas no futuro deste trabalho.

5.2. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DOS FRUTOS

O teste antimicrobiano com o primeiro extrato dos frutos de palmeira juçara foi produzido seguindo a metodologia descrita por NAZARÉ *et al.* 2002 (item 4.5). O extrato não apresentou atividade, o que levou à suspeita de que a metodologia de extração estava degradando compostos. Os principais fatores que influenciam a estabilidade das antocianinas são: a própria estrutura química, o pH, a temperatura, a luz, a presença de oxigênio, a degradação enzimática e as interações entre os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos (ROBBERS *et al.* 1997, MARÇO *et al.* 2008). As antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas. O aquecimento durante o processamento de alimentos provoca a rápida destruição das antocianinas. Processos utilizando baixo tempo em alta temperatura têm sido recomendados para melhor retenção dos pigmentos (ROBBERS *et al.* 1997, MARÇO *et al.* 2008). O oxigênio pode causar degradação das antocianinas por mecanismos de oxidação direta ou indireta, quando constituintes oxidados do meio reagem com as antocianinas. As antocianinas também podem ser degradadas por enzimas endógenas presentes nos tecidos das plantas, tais como glicosidases, polifenol oxidases e peroxidases (ROBBERS *et al.* 1997, MARÇO *et al.* 2008, WALLE 2004). Esta metodologia testada foi então desconsiderada, pois visava apenas obtenção de antocianinas viáveis e poderia excluir outros compostos interessantes, como lipídeos.

A segunda metodologia empregada também foi realizada de acordo com o descrito por NAZARÉ *et al.* 2002, mas modificada (item 4.5). O fator calor foi excluído, devido à literatura mostrar a importância do pH ácido e de solventes de grande abrangência (sendo solução hidroalcoólica uma destas possibilidades) (MARÇO *et al.* 2008). A hipótese é que as altas temperaturas de secagem da polpa tenham levado à degradação de compostos. Durante a manipulação, a temperatura máxima utilizada foi de $\pm 75^{\circ}$ C. Novamente, este método também não se mostrou eficaz.

Retirando o fator calor, outro extrato foi feito de acordo com o descrito por NAZARÉ *et al.* 2002 (item 4.5)., mas sem uso do ácido clorídrico. O segundo fator que poderia alterar significativamente a metodologia de extração e seu resultado seria o pH. A presença de potássio em quantidade relevante (131,88 mg / 100g) poderia levar a um efeito tamponante natural, e a presença do ácido ao invés de preservar compostos estaria levando a uma desestabilização das moléculas ativas (RÍOS e RECIO 2005, MARÇO *et al.* 2008, ALBARICI *et al.* 2007). Este extrato também não apresentou atividade antimicrobiana.

Considerando a alta presença de umidade (97,93 %), poderia a forma de extração estar sendo ineficaz ao retirar metabólitos, por não estar a concentração da solução de álcool etílico em 70%. Então, o último extrato testado quanto a atividade antimicrobiana foi realizado apenas com etanol puro, em frutos frescos na proporção 1 parte de frutos para 1 de solvente, protegido da luz e concentrado sob temperatura de 75° C. O produto final foi uma pasta de cor púrpura intensa, quase negra, inodora e com ótima solubilidade em água (FIGURA 05). Este extrato apresentou atividade com 10mg / mL, em teste prévio de microdiluição em caldo MH para *Candida albicans*, mas apenas em uma das 5 baterias de teste. Portanto, não foi considerado positivo.



FIGURA 05 – Aspecto do produto final obtido pela última metodologia de extração testada. Fonte: Autor, 2010.

Segundo RÍOS e RECIO (2005), o solvente e a extração modificam os resultados finais. O método mais adequado seria aquele em que o extrato seja o mesmo que o medicamento utilizado na fitoterapia, embora o uso de metanol ou etanol sejam muito mais comuns, sobrepostos pelo uso de óleos essenciais. As antocianinas são instáveis em soluções de pH neutro ou alcalino, e às exposições a luz. Como estes compostos são solúveis em solventes polares, devem ser extraídos utilizando soluções etanólicas ou metanólicas contendo ácido clorídrico ou acético. O ácido empregado diminui o pH prevenindo a degradação de antocianinas não aciladas (RÍOS e RECIO 2005, MARÇO *et al.* 2008). Por sua toxicidade, o metanol e o ácido acético foram descartados, dando preferência ao método com etanol e ácido clorídrico. Estudos mostram que, quanto maior a temperatura de armazenamento, mais rápida a velocidade da reação de degradação de antocianinas (ALBARICI *et al.* 2007). Por este motivo o extrato foi mantido sob refrigeração constante, só sendo usado à temperatura ambiente no momento do preparo do meio de cultura de teste.

BORGES (2010) explica em seu trabalho com *E. edulis* que a 85° C há inativação das enzimas da polpa *in natura*. Isso colabora com a hipótese do calor ser um ponto fundamental na análise e manipulação dos frutos. Entretanto, a grande quantidade de umidade da polpa é um fator variável no preparo dos extratos, o que poderia também levar a uma mensuração errônea do processo. A literatura recomenda utilizar pH ácido, mas o produto utilizado pode apresentar toxicidade com componentes ainda não estudados. Retirando todos os fatores que poderiam diretamente afetar o preparo, esta última metodologia testada parecia a mais adequada, e mesmo assim não apresentou resultado positivo.

Entretanto, testes anteriores com extrato bruto aquoso mostraram atividade antimicrobiana na concentração de 10 mg / mL. Como a extração bruta aquosa apresentara atividade, havia algum fator diverso que as demais metodologias testadas não apresentavam. Na tentativa de resolver esta questão, foram feitas extrações com diversos solventes (item 4.5). Nenhum destes apresentou atividade.

A partir destes resultados, supôs-se que algum fator presente na polpa dos frutos da palmeira juçara possuía atividade, mas estava sendo retirado com uso de solventes ou mesmo na manipulação (SURYANARAYANAN *et al.* 2009).

5.3. ÓLEOS DAS SEMENTES

A extração de óleo das sementes dos frutos de *E. edulis* apresentou diferenças no rendimento quando feita a quente ou a frio (item 4.7). O óleo extraído a frio rendeu 4,504g aproximadamente. De aspecto bifásico (uma parte marrom escura, e outra mais leve e mais clara), com odor forte e acre, além de um aspecto rancificado. Este óleo rendeu mais que o óleo extraído a quente (aproximadamente 0,58g), sendo este de cor dourada e com odor menos intenso. O aspecto diferente e o rendimento do óleo a frio em relação ao óleo a quente pode indicar que o calor degrada compostos. Os óleos obtidos não se dissolvem em água, mesmo na presença de *Tween 80* ou DMSO.

Estudos comparativos sobre ácidos graxos e composição protéica do endosperma e embrião de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius), mostraram predominantemente ácidos linoleico, palmítico, oléico e esteárico, embora os valores relativos fossem diferentes para cada tecido. No endosperma de *E. edulis*, lipídios totais representaram em torno de 0,45% do peso total. A composição de ácidos em palmeiras é bem conhecida em duas espécies, *Elaeis guinensis* e *Cocos nucifera*. Nestas, os ácidos láurico, mirístico e palmítico (saturados) são predominantes, diferentes de *E. edulis*, com predominantemente ácidos linoléico, palmítico e oléico (PANZA *et al.* 2009).

Estes três ácidos, assim como outros ácidos graxos, são descritos em vários trabalhos como tendo atividade antimicrobiana (YFF *et al.* 2002, BENKENDORFF *et al.* 2005, HUANG *et al.* 2010), ou atuando sobre a resistência a drogas com esta atividade (HUANG *et al.* 2011). O fato de o óleo estudado não apresentar atividade, no entanto, não significa que não há presença destes ácidos, mesmo tendo sendo descritos anteriormente.

5.4. ISOLAMENTO FÚNGICO

O isolamento fúngico levou à identificação de 21 isolados endofíticos na polpa dos frutos, 3 nas sementes, e 32 isolados epifíticos, totalizando 56 isolados (QUADRO 03).

QUADRO 03 - Fungos epifíticos e endofíticos isolados dos frutos de *E. edulis*.

	FRUTOS DESINFECTADOS - AFL	SEMENTE DOS FRUTOS DESINFECTADOS - AFL SEMENTE	FRUTOS NÃO DESINFECTADOS - AFS
NÚMERO DE FRUTOS	12	10	16
FRAGMENTOS USADOS	3/fruto inteiro	3	3
FUNGOS ISOLADOS	21	3	32
GÊNEROS ENCONTRADOS	<i>Penicillium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Mycelia sterilia</i> , <i>Alternaria</i> spp.	<i>Acremonium</i> spp., <i>Mycelia sterilia</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. , <i>Mycelia sterilia</i>

Legenda: AFL = "Açaí" Fruto Limpo, AFS = "Açaí" Fruto Sujo. Fonte: Autor, 2010.

Os isolados fúngicos foram divididos em 16 morfogrupos, segundo características macromorfológicas semelhantes (QUADRO 04 e FIGURAS 05 a 23).



FIGURA 06 - *Mycelia sterilia* AFS 6 em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B: aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

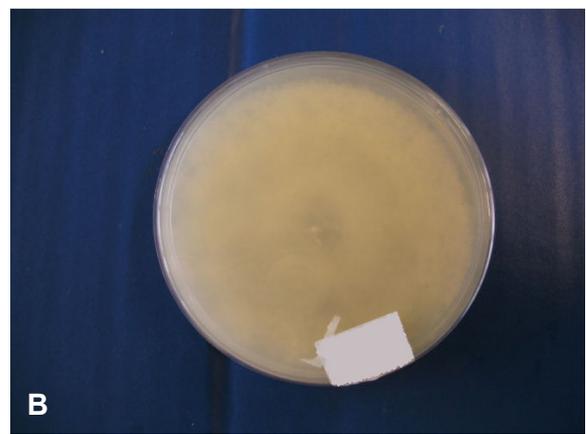


FIGURA 07 - *Mycelia sterilia* AFL 5A em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B: aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

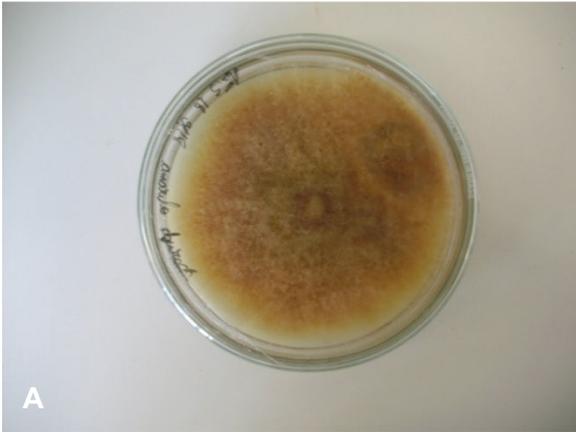


FIGURA 08 - *Mycelia sterilia* AFS 18 em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B: aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

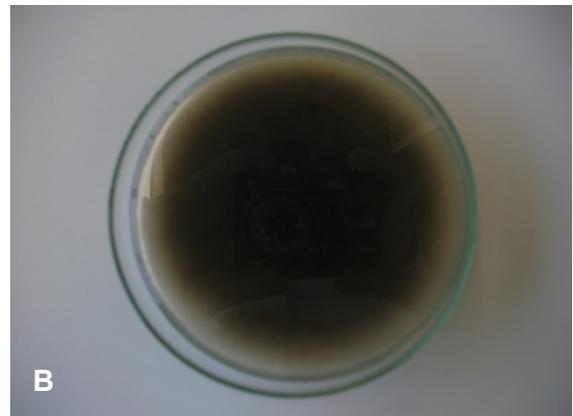
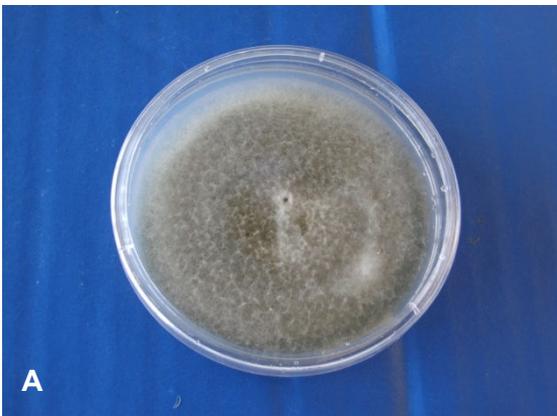


FIGURA 09 - *Mycelia sterilia* AFL 2 em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B: aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

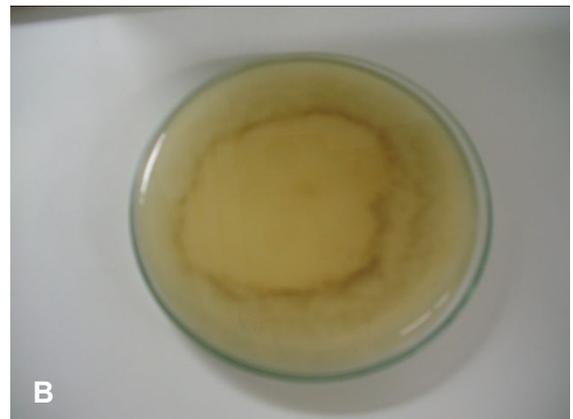
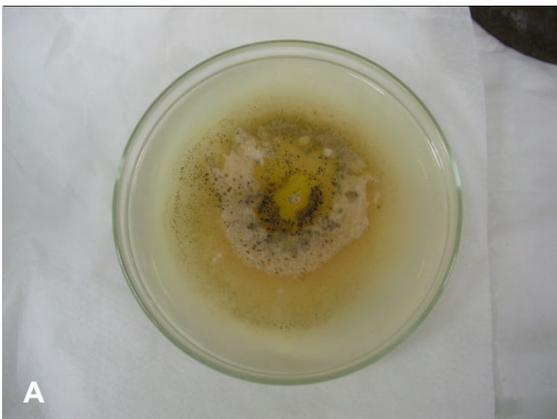


FIGURA 10- *Mycelia sterilia* AFL 6 em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B: aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

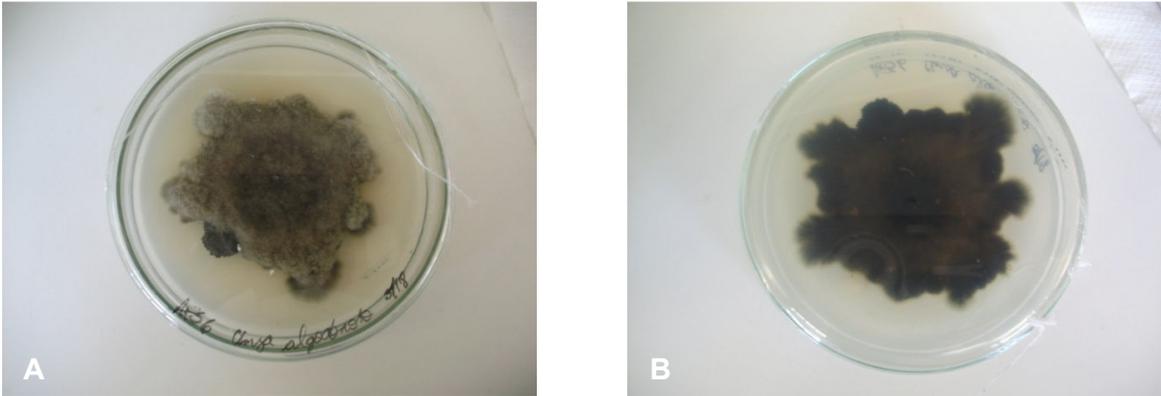


FIGURA 11 - *Mycelia sterilia* AFS 6 B em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B:aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

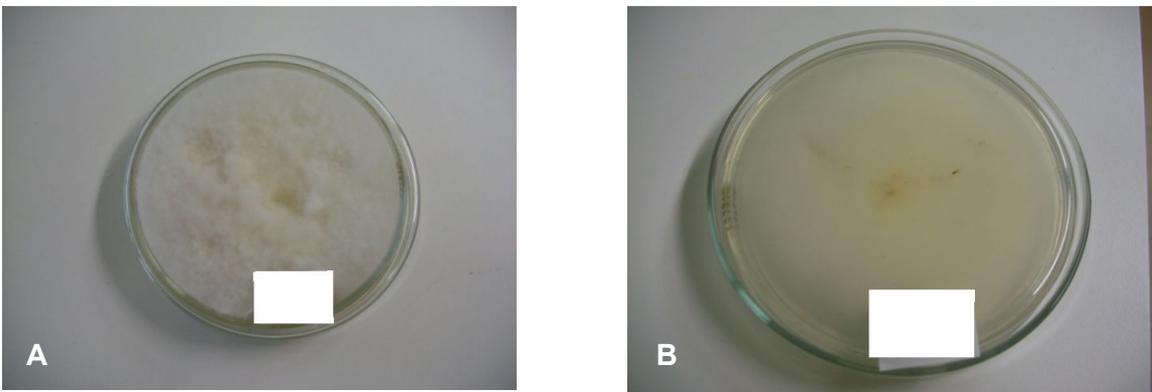


FIGURA 12 - *Mycelia sterilia* AFS 8 em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B:aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

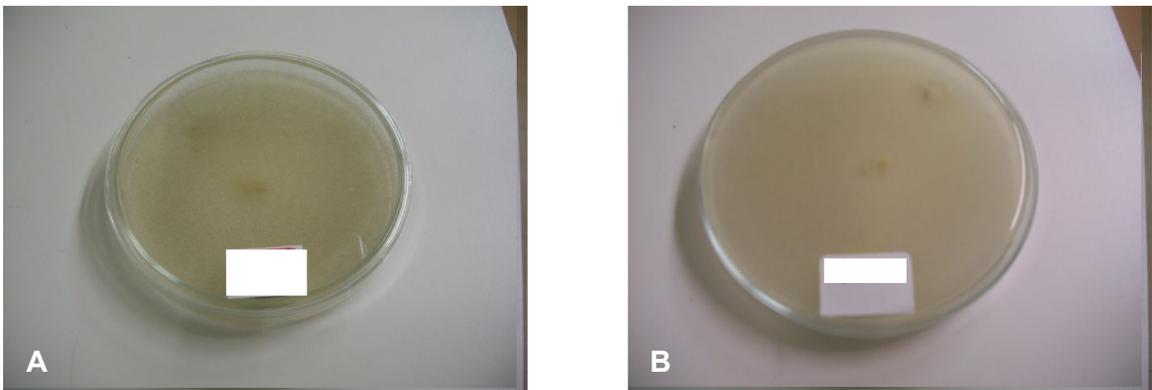


FIGURA 13 - *Mycelia sterilia* AFS 16 em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B:aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

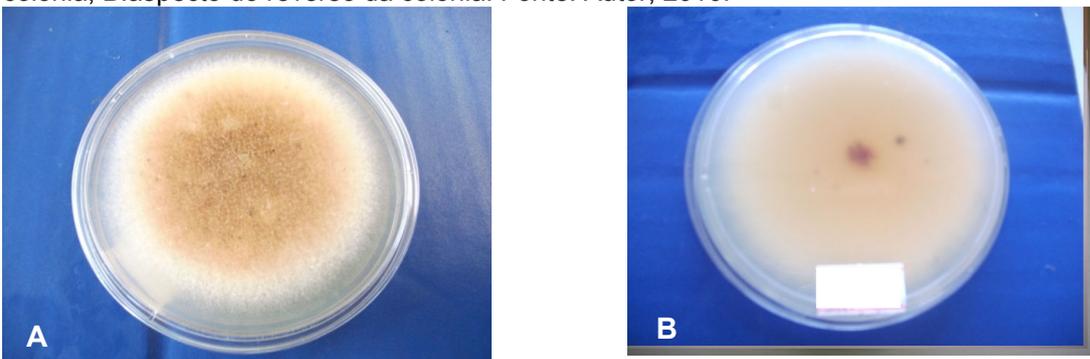


FIGURA 14 - *Mycelia sterilia* AFS 17 A em meio BDA , a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B:aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

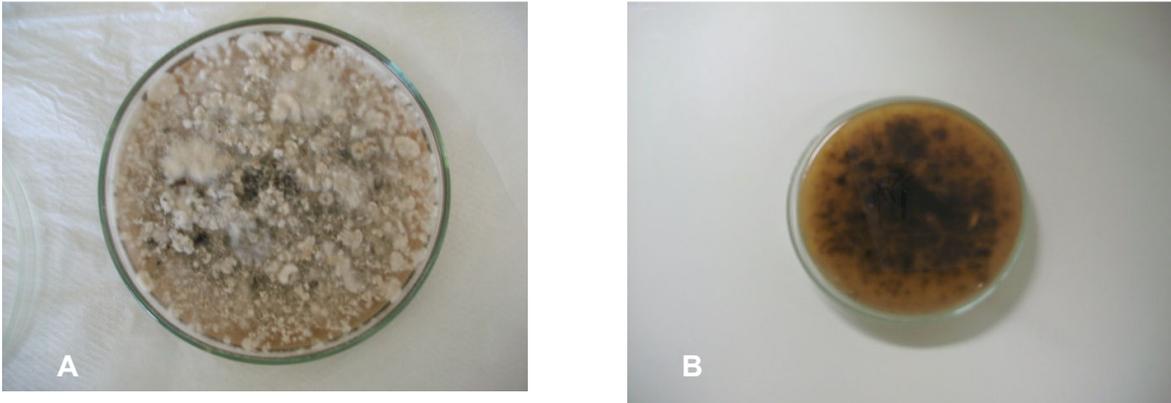


FIGURA 15 - *Mycelia sterilia* AFS 17 B em meio BDA, a 28° C por 6 dias. A: aspecto do verso da colônia, B: aspecto do reverso da colônia. Fonte: Autor, 2010.

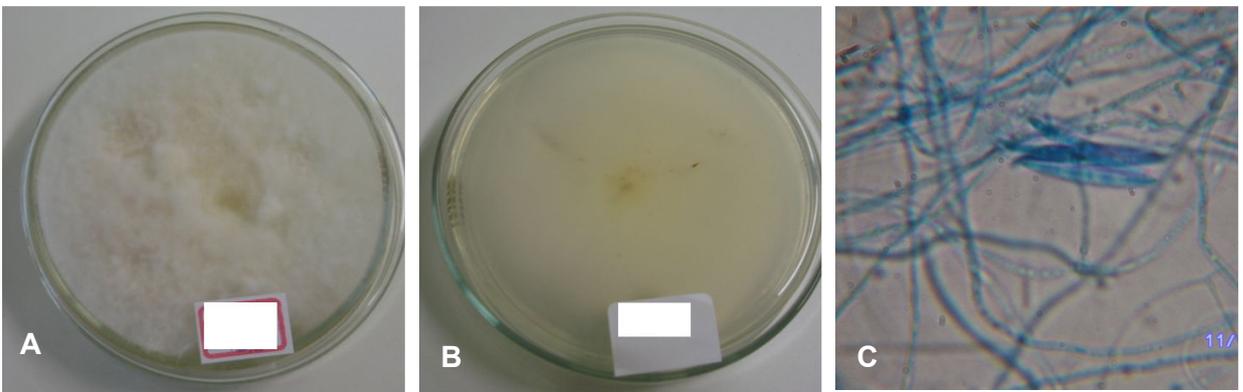


FIGURA 16 - *Fusarium* spp. AFS 8 em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 400x com coloração de lactofenol azul. Fonte: Autor, 2010.

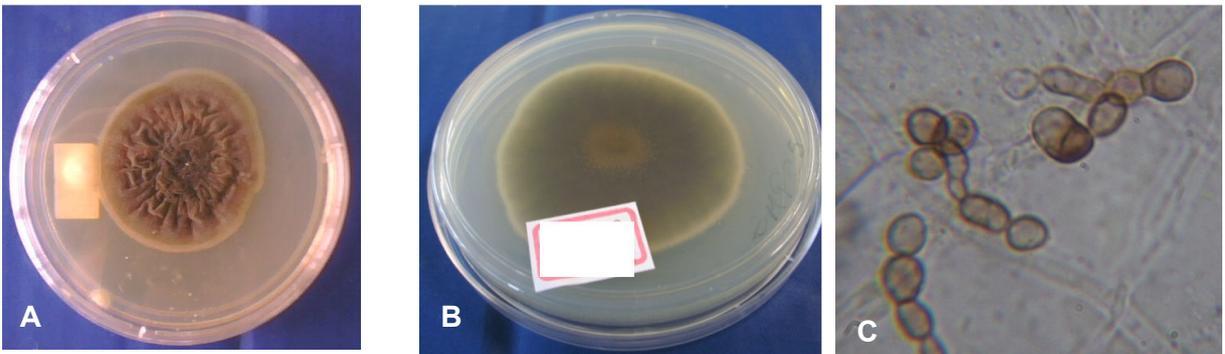


FIGURA 17 - *Alternaria* spp. AFS 20B em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 400x. Fonte: Autor, 2010.

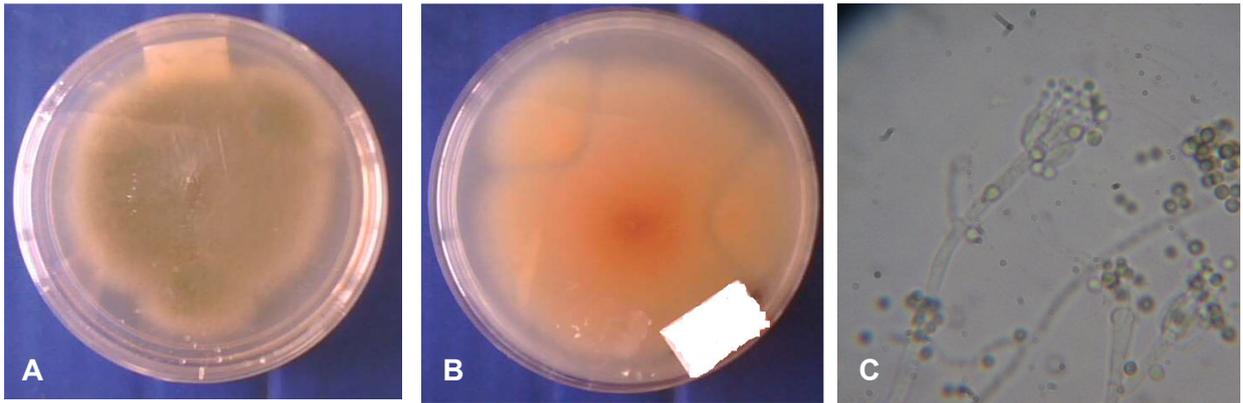


FIGURA 18 – *Penicillium* spp. AFS 2 em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 100x. Fonte: Autor, 2010.

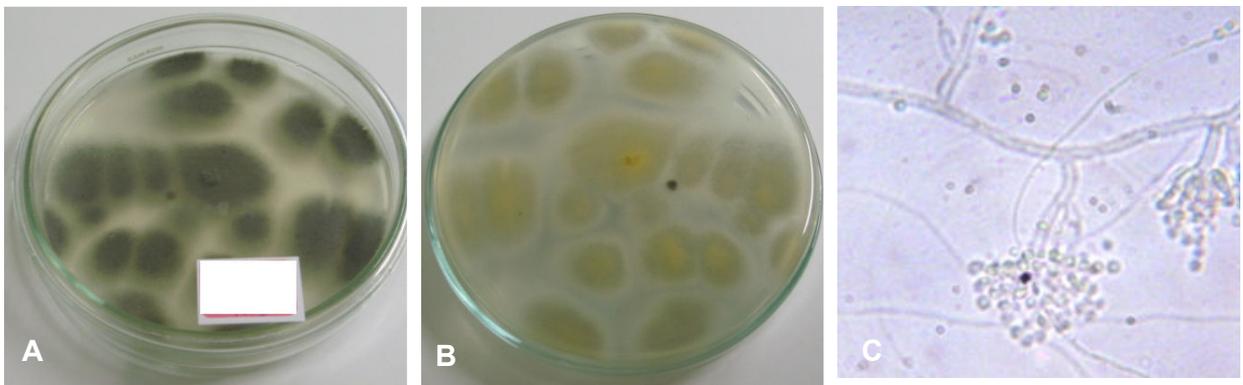


FIGURA 19 – *Penicillium* spp. AFL 0 em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 400x. Fonte: Autor, 2010.

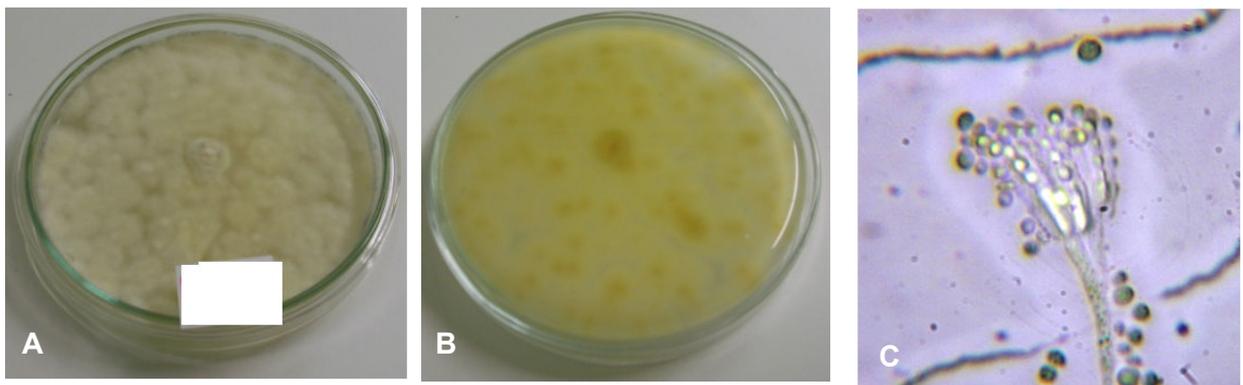


FIGURA 20 – *Penicillium* spp. AFL 4 em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 400x. Fonte: Autor, 2010.

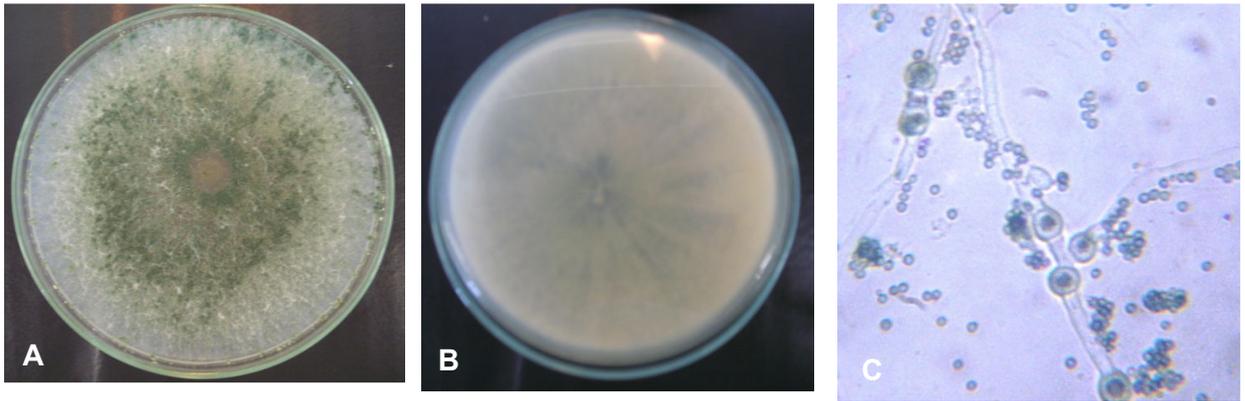


FIGURA 21 – *Trichoderma* spp. AFL 10 em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 100x. Fonte: Autor, 2010.

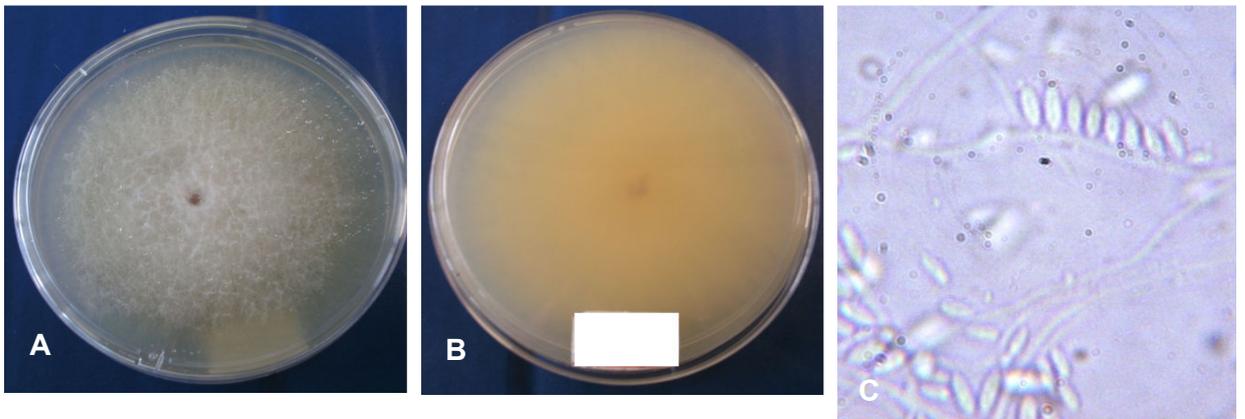


FIGURA 22 – *Acremonium* spp. AFL SEMENTE em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 400x. Fonte: Autor, 2010.

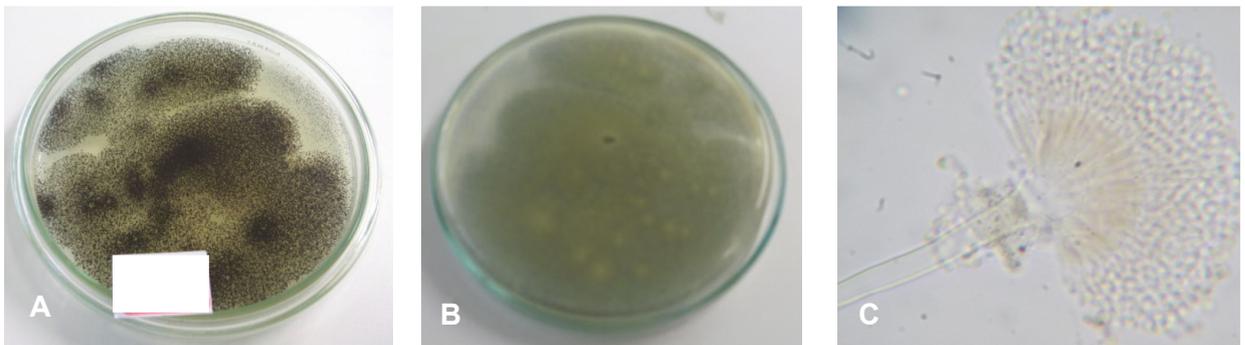


FIGURA 23 - *Aspergillus* spp. AFS 7 em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 100x. Fonte: Autor, 2010.

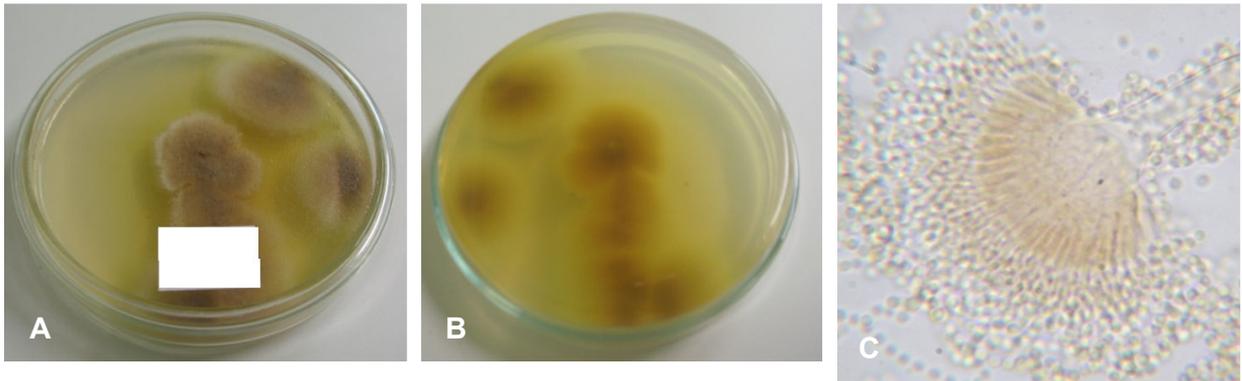


FIGURA 24 – *Aspergillus* spp. AFS 28 em meio BDA. A: verso a 28° C por 6 dias. B: reverso a 28° C por 6 dias. C: aumento de 100x. Fonte: Autor, 2010.

Fungos endofíticos em árvores tropicais representam um importante componente sustentável da biodiversidade de fungos (ARNOLD *et al.* 2001). Estudos de fungos endofíticos em palmeiras ocorrem com pouca frequência, e dentro do gênero *Euterpe* há pouquíssimos trabalhos. Não foram encontrados registro de trabalhos com fungos endofíticos em palmeiras do gênero *Euterpe* spp. na região de Mata Atlântica no Estado do Paraná, ou mesmo na região sul do Brasil. Em *Trachycarpus fortunei*, uma palmeira de clima temperado da região asiática, foram encontrados *Alternaria*, *Acremonium* e *Fusarium* entre os endofíticos, dentre outros gêneros, que coincidem com alguns dos fungos encontrados no trabalho realizado, sendo que a região geográfica da coleta dos frutos de *E. edulis* utilizada também encontra-se em clima temperado. RODRIGUES (1994) estudou isolados fúngicos em folhas de açaí (*Euterpe oleracea*) e encontrou 13 espécies de Xylariaceae dominante entre os 21 taxa, sendo que *Xylaria cubensis* foi o mais importante endófito (RODRIGUES, 1994 *apud* FROHLICH *et al.* 2000). Dentre as 64 espécies nos 35 gêneros isolados em *Euterpe oleracea*, 2 espécies e 10 gêneros foram similares aos encontrados em *Licuala* spp. em Brunei e *L. ramsayi* na Austrália (RODRIGUES, 1994 *apud* FROHLICH *et al.* 2000). FROHLICH comenta que a composição da comunidade do açaí estudada por RODRIGUES em 1994 é bastante similar aos encontrados em seu estudo. A comunidade endofítica em *Stylosanthes guianensis* possui 3 espécies de maior destaque: *Xylaria* (anamorfo), *Glomerella cingulata* e *Phomopsis* (PEREIRA *et al.* 1993 *apud* FROHLICH *et al.* 2000), que também estavam presentes em *E. oleracea*. A micota endofítica parece ter um padrão próximo na composição taxonômica.

QUADRO 04 - Morfotipos de fungos isolados dos frutos de *E. edulis*.

Grupo	Coloração	Aspecto Da Superfície	Verso Da Cultura	Outras Características	Número
1	Marron-Amarelada	Pulverulento	Amarelado	Não	3
2	Preta	Pulverulento	Cinza	Não	2
3	Branca	Algododoso	Amarelado	Não	5
4	Branca	Algododoso	Claro	Não	6
5	Marron-Amarelada	Algodonoso	Amarelado	Não	2
6	Verde	Pulverulento	Claro	Não	11
7	Branca	Pulverulento	Claro	Não	2
8	Preta	Rígido	Negro	Não	3
9	Preta	Algodonoso	Escuro	Não	2
10	Branco-Amarelada	Cremoso	Branco	Pontos escuros no Verso e Superfície	1
11	Verde	Algodonoso	Claro	Superfície Irregular	10
12	Branca	Algodonoso Denso	Rosado	Não	2
13	Preto-Amarronzada	Algodonoso	Marrom	Não	4
14	Branca-Acinzentada	Algodonoso	Acinzentado	Pontuações Marrons na Superfície	1
15	Marrom	Algodonoso Denso	Rosado	Bordas Brancas, Pontuações Marrons na Superfície	1
16	Branca-Amarronzada	Algodonoso	Marrom	Aspecto Desigual Granular	1

Fonte: Autor, 2010.

O fato de os isolamentos serem dos frutos e sementes, e não de folhas ou outras partes da planta, pode interferir na diferença de resultado encontrado em *E. oleracea*. Foram encontrados fungos de gêneros também encontrados em outras palmeiras, o que pode significar correlações com plantas da mesma região geográfica. Seria necessário confirmar em outros estudos mais específicos com isolados de várias partes do vegetal em diferentes épocas do ano, e em diversos ambientes de cultivo, além de isolados das espécies irmãs e de outras plantas do

mesmo local (ARNOLD *et al.* 2001, HYDE E SOYTONG 2008 *apud* SURYANARAYANAN *et al.* 2009).

5.5. TESTE ANTIMICROBIANO POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR

Foram realizados testes antimicrobianos com sete fungos endofíticos isolados (AFL), sete fungos epifíticos isolados (AFS) e um fungo endofítico isolado da semente (AFL), em meio BDA e Saboraud. São eles: *Penicillium* spp. 1 - AFL 0, *Penicillium* spp. 2 - AFL 1, *Trichoderma* spp. - AFL 10, *Penicillium* spp. 3 - AFL 2, *Mycelia sterilia* 1 - AFL 5A, *Mycelia sterilia* 2 - AFL 5B, *Alternaria* spp. 1 - AFL 6, *Acremonium* spp. - AFL SEMENTE, *Mycelia sterilia* 3 - AFS 17, *Mycelia sterilia* 4 - AFS 18, *Penicillium* spp. 4 - AFS 2, *Alternaria* spp. 2 - AFS 20B, *Aspergillus* spp. - AFS 28, *Mycelia sterilia* 5 - AFS 6 e *Fusarium* spp. - AFS 8. Este teste foi realizado com o intuito de verificar se a ação antimicrobiana da polpa do fruto era oriunda de substâncias da própria planta ou de fungos endofíticos presentes na mesma.

Dos 15 fungos testados, *Penicillium* spp. 1, *Penicillium* spp. 2, *Trichoderma* spp., *Mycelia sterilia* 2, *Alternaria* spp. 2, e *Aspergillus* spp. apresentaram atividade contra *S. aureus* em meio BDA, com halos de inibição de 5 a 6 mm, 4 a 5 mm, 8 a 10 mm, 4 a 6 mm, 8 a 12 mm, e 12 a 16 mm respectivamente (QUADRO 05).

Os fungos *Penicillium* spp. 1, *Acremonium* spp., *Alternaria* spp. 2, e *Aspergillus* spp. atuaram contra MRSA em meio BDA, com halos de inibição de 2 a 6 mm, 2 a 3 mm, 10 mm e 8 a 10 mm respectivamente (QUADRO 06).

Em meio Sabouraud, *Trichoderma* spp. apresentou atividade contra *S. aureus* e *E. coli*, com halos de inibição de 6 a 10 mm. O fungo *Penicillium* spp. 4 atuou contra *C. albicans*, com inibição de 10mm de diâmetro. *Penicillium* spp. 1, *Trichoderma* spp., e *Aspergillus* spp. Apresentaram atividade contra MRSA (halos de inibição de 4 mm, 12 a 16 mm e 6 mm respectivamente). Dentre estes, *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. 1 e *Aspergillus* spp. apresentaram inibição nos 2 meios de cultura, para os mesmos micro-organismos (QUADROS 05 e 06).

Os testes demonstram que o metabólito produzido pelos fungos pode ter boa capacidade de difusão em ágar MH, pois foram observados halos de até 16 milímetros de diâmetro (*Aspergillus* spp.). O isolado mais efetivo foi *Trichoderma* spp., que teve atividade contra 3 organismos diferentes (*S. aureus*, *E. coli* e MRSA)

em meio Sabouraud, com halos de 6 a 10 mm, 6 a 10 mm e 12 a 16 mm (QUADROS 05 e 06).

QUADRO 05 - Resultados dos testes antimicrobianos com fungos endofíticos e epifíticos isolados de *E. edulis* em meio BDA.

FUNGO EM MEIO BDA	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	MRSA	Controle positivo
<i>Penicillium</i> spp. 1 (AFL 0)	5 a 6 mm	S.I.	S.I.	S.I.	2 a 6 mm	8 mm
<i>Penicillium</i> spp. 2 (AFL 1)	4 a 5 mm	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	8 mm
<i>Trichoderma</i> spp. (AFL 10)	8 a 10 mm	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	8 mm
<i>Penicillium</i> spp. 3 (AFL 2)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	8 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 1 (AFL 5A)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	9 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 2 (AFL 5B)	4 a 6 mm	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Alternaria</i> spp. 1 (AFL 6)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Acremonium</i> spp. (AFL SEMENTE)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	2 a 3 mm	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 3 (AFS 17)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	8 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 4 (AFS 18)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	9 mm
<i>Penicillium</i> spp. 4 (AFS 2)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Alternaria</i> spp. 2 (AFS 20B)	8 a 12 mm	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm	10 mm
<i>Aspergillus</i> spp. (AFS 28)	12 a 16 mm	S.I.	S.I.	S.I.	8 a 10 mm	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 5 (AFS 6)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Fusarium</i> spp. (AFS 8)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	

Legenda: AFL = "Açaí" Fruto Limpo, AFS = "Açaí" Fruto Sujo, MRSA: *S. aureus* Meticilina Aminoglicosídeo Resistente. A medida em mm refere-se ao comprimento do diâmetro do halo de inibição. S.I.: Sem Inibição. Fonte: Autor, 2010.

A atividade antimicrobiana observada em testes anteriores com extrato bruto aquoso na concentração de 10mg/mL (item 5.2) pode estar relacionada à presença destes fungos. Considerando a metodologia utilizada para extração, os fungos endofíticos e epifíticos não sobrevivem, o que pode acarretar a falta de atividade antibiótica nos testes realizados. Testes futuros com estes organismos poderiam mostrar outros componentes bioquímicos interessantes, inclusive para testes

antimicrobianos, dentro da comunidade endofítica de *E. edulis*. Uma série de produtos naturais bioativos isolados de fungos endofíticos já foram relatados, entre eles antimicrobianos, tais como: alcalóides, peptídeos, esteróides, triterpenóides, quinonas, flavonóides, compostos alifáticos e fenóis (YU *et al* 2010).

QUADRO 06 - Resultados dos testes antimicrobianos com fungos endofíticos e epifíticos isolados de *E. edulis* em meio SBR.

FUNGO EM MEIO SBR	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	MRSA	Controle positivo
<i>Penicillium</i> spp. 1 (AFL 0)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	4 mm	9 mm
<i>Penicillium</i> spp. 2 (AFL 1)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Trichoderma</i> spp. (AFL 10)	6 a 10 mm	6 a 10 mm	S.I.	S.I.	12 a 16 mm	10 mm
<i>Penicillium</i> spp. 3 (AFL 2)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 1 (AFL 5A)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	8 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 2 (AFL 5B)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	9 mm
<i>Alternaria</i> spp. 1 (AFL 6)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Acremonium</i> spp. (AFL SEMENTE)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 3 (AFS 17)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 4 (AFS 18)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Penicillium</i> spp. 4 (AFS 2)	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm	S.I.	9 mm
<i>Alternaria</i> spp. 2 (AFS 20B)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Aspergillus</i> spp. (AFS 28)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	4 a 6 mm	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 5 (AFS 6)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Fusarium</i> spp. (AFS 8)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	8 mm

Legenda: AFL = "Açaí" Fruto Limpo, AFS = "Açaí" Fruto Sujo.; *S. aureus* Meticilina Aminoglicosídeo Resistente. A medida em mm refere-se ao comprimento do diâmetro do halo de inibição. S.I.: Sem Inibição. Fonte: Autor, 2010.

A composição do meio pode levar a uma resposta diferenciada dos fungos frente às cepas utilizadas. A atividade antimicrobiana de alguns dos gêneros encontrados no presente estudo (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Acremonium* spp., *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp.) já é bastante documentada (GALLARDO *et al.* 2006, VIZCAINO *et al.* 2005, FURTADO *et al.* 2002, PELAEZ *et*

al. 1998). *Trichoderma* spp., que atua sobre *S. aureus*, também atua contra *C. albicans* e *E. coli*, o que sugere que os compostos produzidos possuem um mecanismo distinto. A forma como estes fungos atuam poderia ser tanto provocada por resposta a estímulos externos, como luz, temperatura de crescimento e quantidade de recursos disponíveis, quanto por metabolismo natural (SURYANARAYANAN *et al.* 2009). Estudos sobre o mecanismo de produção do princípio ativo serão investigados futuramente.

5.6. MEIO MODIFICADO COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO DOS FRUTOS

Após os testes com fungos isolados, percebeu-se que 8 fungos apresentavam atividade antimicrobiana: *Penicillium* spp. 1, *Penicillium* spp. 2, *Trichoderma* spp., *Mycelia sterilia* 2, *Acremonium* spp., *Penicillium* spp. 4, *Alternaria* spp. 2, e *Aspergillus* spp. Foi realizado o crescimento destes em meio acrescido de extrato hidroalcólico dos frutos de *E. edulis* para examinar a possibilidade de apresentarem diferenças na sua atividade antimicrobiana, tendo o meio sido modificado (FIGURAS 25 a 31). Macroscopicamente, 2 fungos (*Mycelia sterilia* 2 e *Acremonium* spp.) apresentaram mudanças na coloração no verso da colônia (FIGURAS 27 e 30), e o reverso da colônia não foi observado devido à coloração púrpura-escura do meio, que impossibilita a visualização.

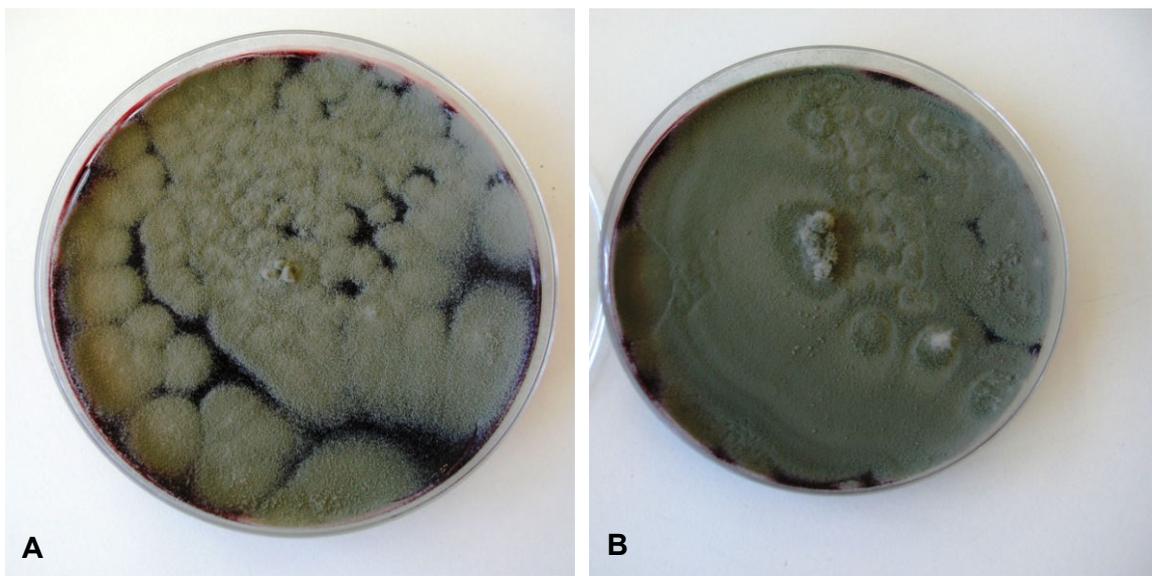


FIGURA 25 – *Penicillium* spp. AFL 0 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias. A: cultura em meio BDAA, B: cultura em meio SBRA. Fonte: Autor, 2010.

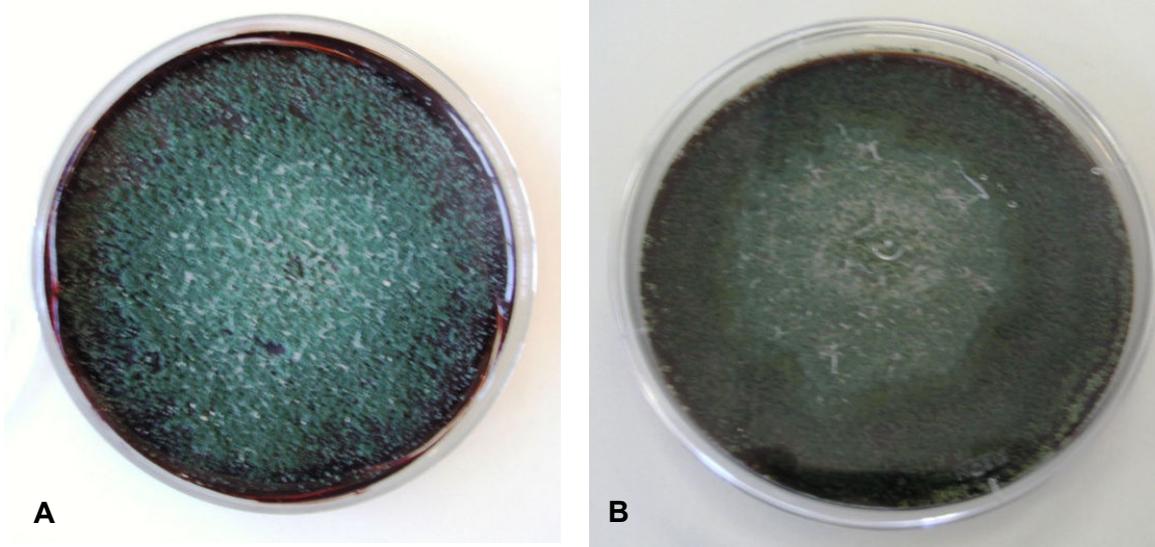


FIGURA 26 – *Trichoderma* spp. AFL 10 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias. A: cultura em meio BDAA, B: cultura em meio SBRA. Fonte: Autor, 2010.

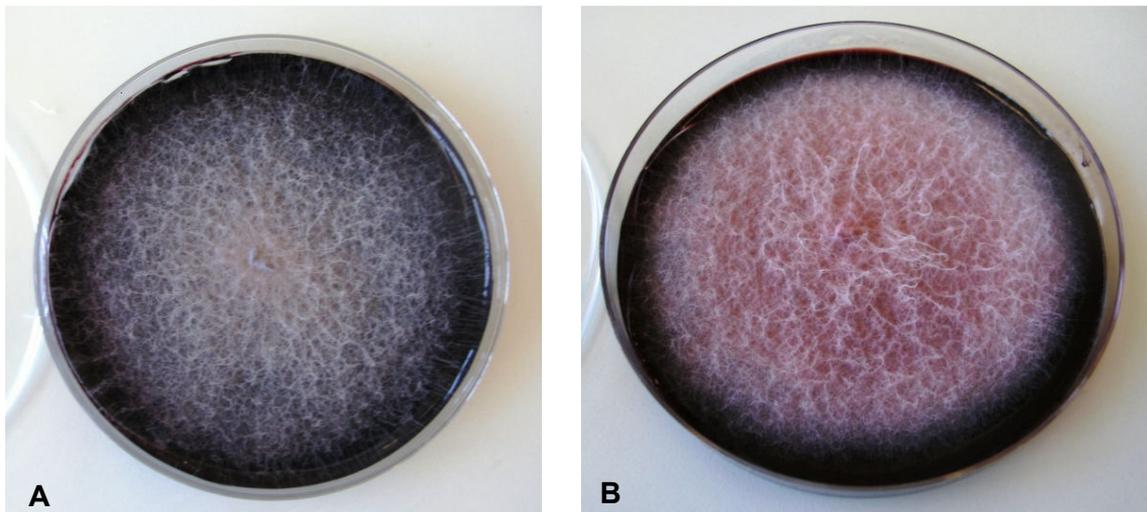


FIGURA 27 – *Acremonium* spp. AFL SEMENTE em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias. A: cultura em meio BDAA, B: cultura em meio SBRA. Fonte: Autor, 2010.

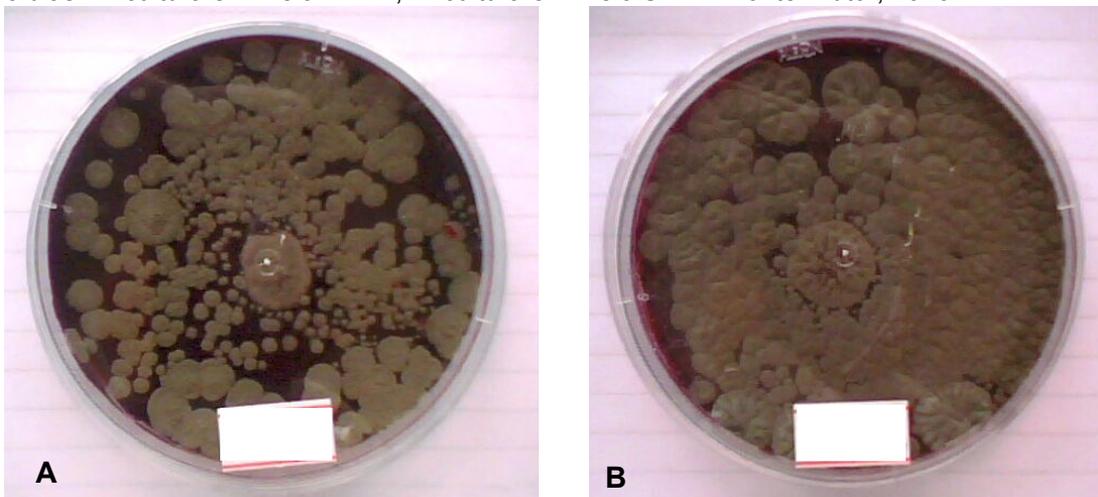


FIGURA 28 – *Penicillium* spp. AFS2 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias. A: cultura em meio BDAA, B: cultura em meio SBRA. Fonte: Autor, 2010.

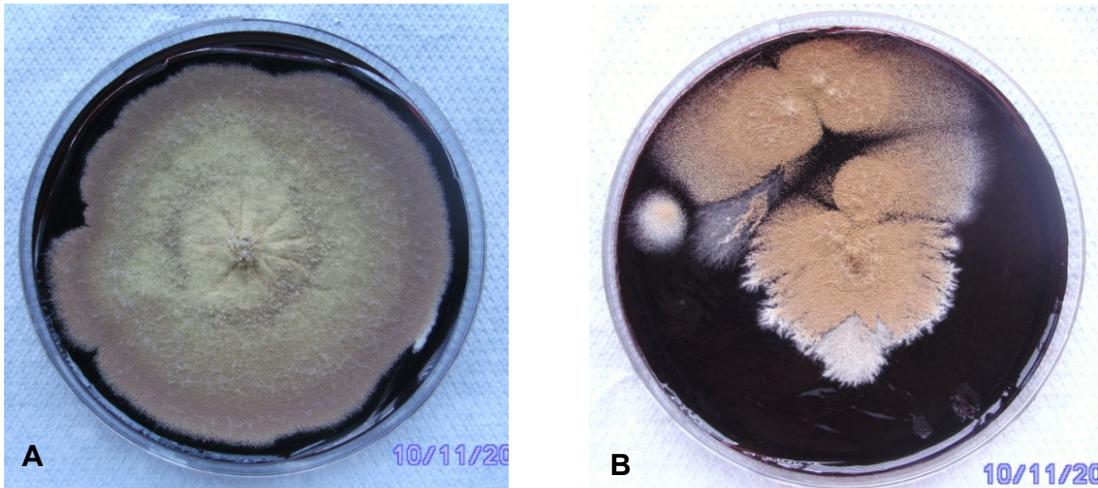


FIGURA 29 – *Aspergillus* spp. AFS 28 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias. A: cultura em meio BDAA, B: cultura em meio SBRA. Fonte: Autor, 2010.

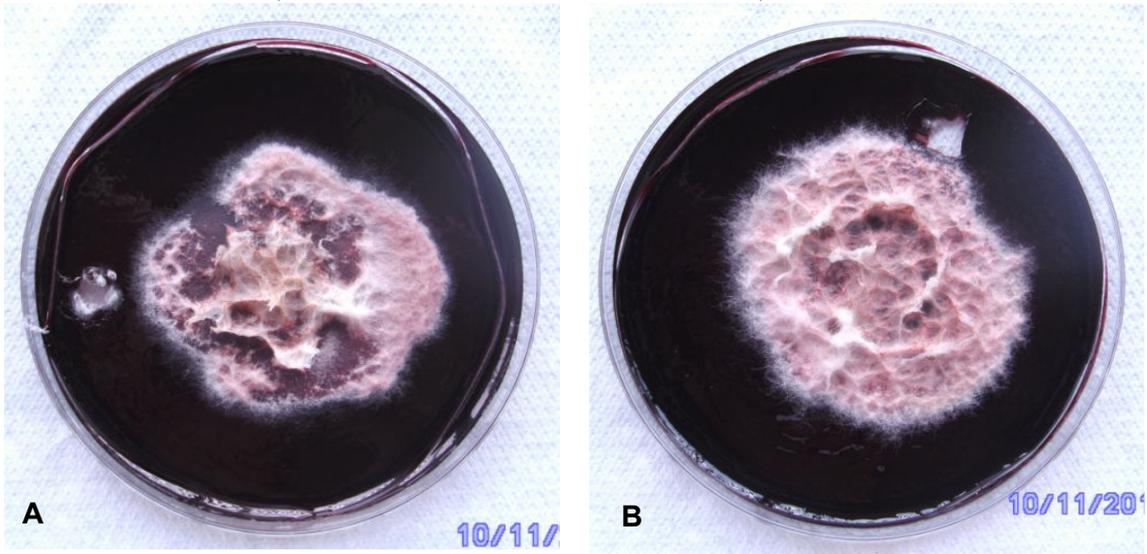


FIGURA 30 – *Mycelia sterilia* AFL 5B em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias. A: cultura em meio BDAA, B: cultura em meio SBRA. Fonte: Autor, 2010.

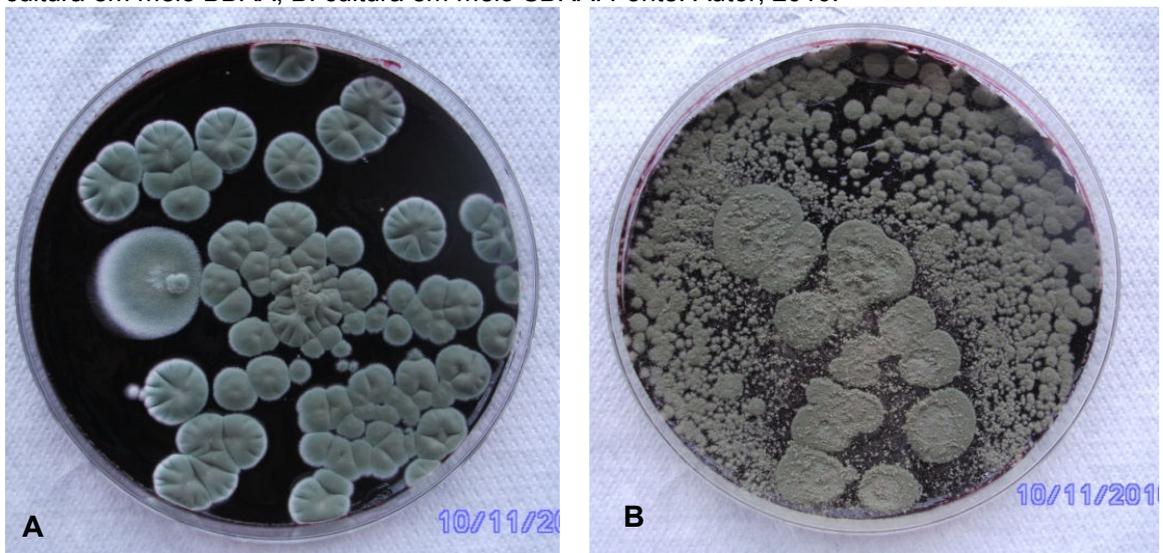


FIGURA 31 - *Penicillium* spp. AFL 1 em meio modificado com extrato, a 28° C por 6 dias. A: cultura em meio BDAA, B: cultura em meio SBRA. Fonte: Autor, 2010.

O teste antimicrobiano mostrou inibição da atividade antimicrobiana por *Penicillium* spp. 2, *Mycelia sterilia* 2 e *Alternaria* spp. 2 em meio BDAA, e *Trichoderma* spp. nos dois meios. Houve alteração no comprimento do diâmetro do halo de inibição em *Penicillium* spp. 1 e *Aspergillus* spp. (nos dois meios utilizados para crescimento) e em *Acremonium* spp. em meio BDAA. Observou-se também atividade antimicrobiana de alguns fungos contra cepas que anteriormente não inibira, como *Penicillium* spp. 1 e *Aspergillus* spp. nos dois meios de cultura, *Penicillium* spp. 2 em meio BDAA, *Acremonium* spp. em meio SBRA, e *Penicillium* spp. 4 em meio SBRA (Quadros 07, 08 e 09).

QUADRO 07 - Resultados dos testes antimicrobianos dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de *E. edulis*, cultivados em meio BDA modificado por adição de extrato hidroalcolico dos frutos (meio BDAA).

FUNGO EM MEIO BDAA	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	MRSA	Controle positivo
<i>Penicillium</i> sp 1 (AFL 0)	8 mm	10 mm	1 mm	2 a 4 mm	10 mm	10 mm
<i>Penicillium</i> spp. 2 (AFL 1)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Trichoderma</i> spp. (AFL 10)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 2 (AFL 5B)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Acremonium</i> spp. (AFL SEMENTE)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	3 a 5 mm	10 mm
<i>Penicillium</i> spp. 4 (AFS 2)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Alternaria</i> spp. 2 (AFS 20B)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Aspergillus</i> spp. (AFS 28)	2 mm	4 mm	S.I.	2 mm	6 a 8 mm	10 mm

Legenda: AFL = "Açaí" Fruto Limpo, AFS = "Açaí" Fruto Sujo, MRSA: *S. aureus* Meticilina Aminoglicosídeo Resistente. A medida em mm refere-se ao comprimento do diâmetro do halo de inibição. S.I.: Sem Inibição. Fonte: Autor, 2010.

No teste antimicrobiano com fungos cultivados em meio BDA ou Sabouraud modificado com extrato hidroalcolico dos frutos de *E. edulis*, observou-se que *Penicillium* spp. 1 em meio BDA atuou somente contra *S. aureus* e MRSA, com halos de inibição de 5 a 6 mm e 2 a 6 mm, passando a atuar também contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* quando em meio BDAA, com halos de 10 mm, 1mm e 2

a 4 mm, respectivamente. Também observou-se aumento do diâmetro nos halos formados contra *S. aureus* e MRSA, que passaram a 8 mm e 10 mm. Em meio Sabouraud *Penicillium* spp. 1 atuou somente contra MRSA, com halos de 4 mm, mas em meio SBRA atuou também sobre *S. aureus*, *E. coli*, e *C. albicans*, com inibição de 10 mm, 10 mm, 4 a 6 mm respectivamente, e tendo aumento no tamanho do halo para MRSA para 11 mm (FIGURAS 32, 33, 34, 35 e 39).

QUADRO 08 - Resultados dos testes antimicrobianos dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de *E. edulis*, cultivados em meio Sabouraud modificado por adição de extrato hidroalcolólico dos frutos (meio SBRA).

FUNGO EM MEIO SBRA	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	MRSA	Controle positivo
<i>Penicillium</i> sp 1 (AFL 0)	10 mm	10 mm	S.I.	4 a 6 mm	11 mm	10 mm
<i>Penicillium</i> spp. 2 (AFL 1)	4 mm	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Trichoderma</i> spp. (AFL 10)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Mycelia sterilia</i> 2 (AFL 5B)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Acremonium</i> spp. (AFL SEMENTE)	4 mm	S.I.	S.I.	4 a 6 mm	5 mm	10 mm
<i>Penicillium</i> spp. 4 (AFS 2)	4 a 6 mm	S.I.	S.I.	S.I.	6 a 8 mm	9 mm
<i>Alternaria</i> spp. 2 (AFS 20B)	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	10 mm
<i>Aspergillus</i> spp. (AFS 28)	20 mm	S.I.	S.I.	S.I.	24 mm	10 mm

Legenda: AFL = "Açaí" Fruto Limpo, AFS = "Açaí" Fruto Sujo, MRSA: *S. aureus* Meticilina Aminoglicosídeo Resistente. A medida em mm refere-se ao comprimento do diâmetro do halo de inibição. S.I.: Sem Inibição. Fonte: Autor, 2010.

Penicillium spp. 2 apresentou diferenças na ação antimicrobiana, sendo que antes atuava contra *S. aureus* em meio BDA com halo de 4 a 5 mm, mas não teve mais efeito quando em meio BDAA. Em meio Sabouraud não teve ação inibitória, mas em meio SBRA atuou contra *S. aureus* com inibição de 4 mm de diâmetro.

Trichoderma spp. não atuou mais para *S. aureus* em meio BDAA. Em meio Sabouraud demonstrava halos de inibição de 6 a 10 mm e 12 a 16 mm, respectivamente contra *S. aureus* e MRSA, mas não atuou mais contra *S. aureus* e MRSA em meio SBRA.

Mycelia sterilia 2 apresentava halos de 4 a 6 mm contra *S. aureus*, porém não teve atividade antimicrobiana contra nenhuma cepa bacteriana em meio BDAA nem em meio SBRA.

Acremonium spp. manteve mesma ação em meio BDAA, tendo aumento em seu halo de inibição (de 2 a 3 mm para 3 a 5 mm), e em meio SBRA passou a atuar contra *S. aureus* e *C. albicans*, tendo halos de 4 mm e 4 a 6 mm (FIGURAS 33, 36, 37 e 40).

Penicillium spp. 4, que apresentava ação contra *C. albicans* em meio Sabouraud, não inibiu mais o crescimento desta cepa, mas passou a ter atividade contra *S. aureus* e MRSA em meio SBRA (FIGURAS 32 e 33).

Alternaria spp. 2 passou a não ter mais atividade antimicrobiana, mesmo contra *S. aureus* e MRSA, contra os quais apresentou atividade anteriormente (halos de 8 a 12 mm e 10 mm).

Aspergillus spp. em meio BDA demonstrava atividade contra *S. aureus* (12 a 16 mm de inibição) e MRSA (8 a 10 mm). Passou a ter atividade contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, e MRSA em meio BDAA. Em meio SBRA passou a ter atividade também contra *S. aureus*, quando que em meio Sabouraud atuava contra MRSA somente. Um dado observado foi que os halos de inibição contra *S. aureus* e MRSA divergiram entre os meios BDA e BDAA, tendo diminuição de 12 a 16 mm para 2 mm em *S. aureus*, e de 8 a 10 mm para 6 a 8 mm em MRSA (FIGURA 36, 37, 38 e 41).

Todos os dados acima estão resumidos no quadro 09.

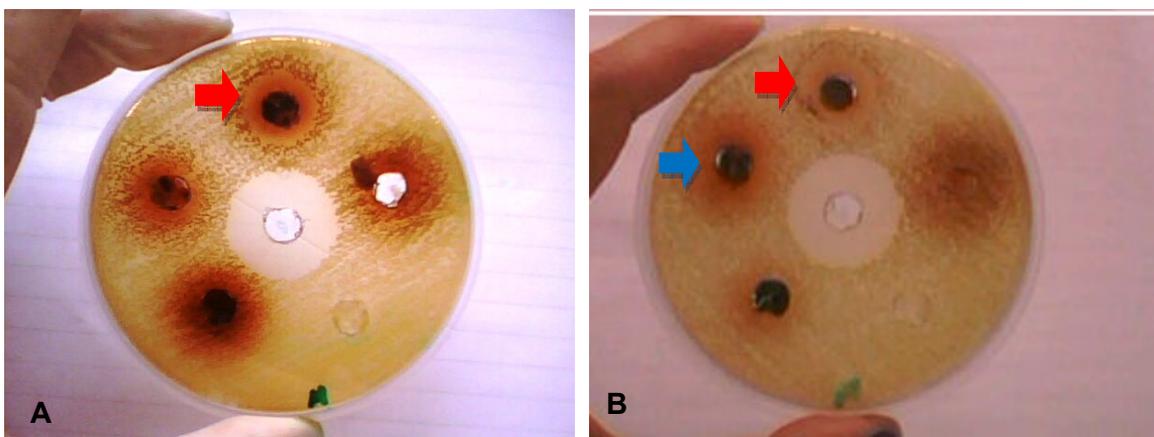


FIGURA 32 - Teste antimicrobiano contra MRSA. A: *Penicillium* sp 1 AFL 0 em BDAA (seta vermelha) B: *Penicillium* sp 1 AFL 0 em SBRA (seta vermelha), e *Penicillium* spp. 4 AFS 2 em SBRA (seta azul). Fonte: Autor, 2010.

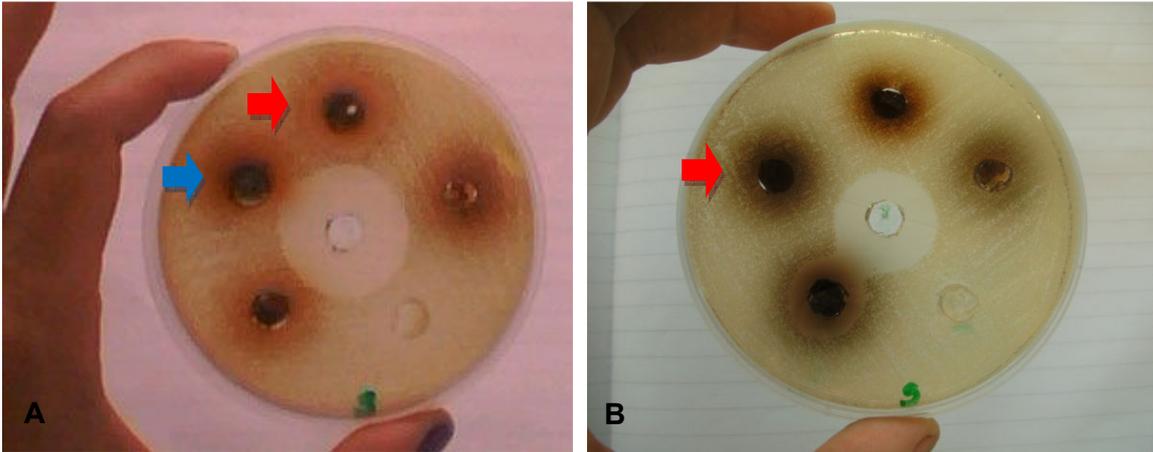


FIGURA 33 - Teste antimicrobiano contra *S. aureus*. A: *Penicillium* spp. 1 AFL 0 em SBRA (seta vermelha) com inibição de 4,5 mm de diâmetro., e *Penicillium* spp. 4 AFS 2 em SBRA (seta azul) com inibição de 2 a 3 mm de diâmetro. B: *Acremonium* spp. AFL SEMENTE em SBRA (seta vermelha) com inibição de 1,5 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

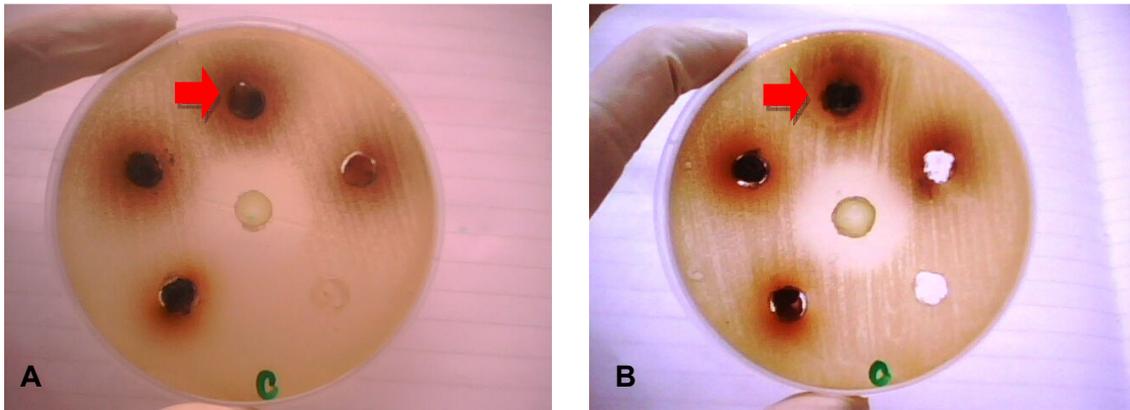


FIGURA 34 - Teste antimicrobiano contra *C. albicans*. A: *Penicillium* spp. 1 AFL 0 em BDAA (seta vermelha) com inibição de 1 a 2 mm de diâmetro. B: *Penicillium* spp. 1 AFL 0 em SBRA (seta vermelha) com inibição de 2 a 3 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

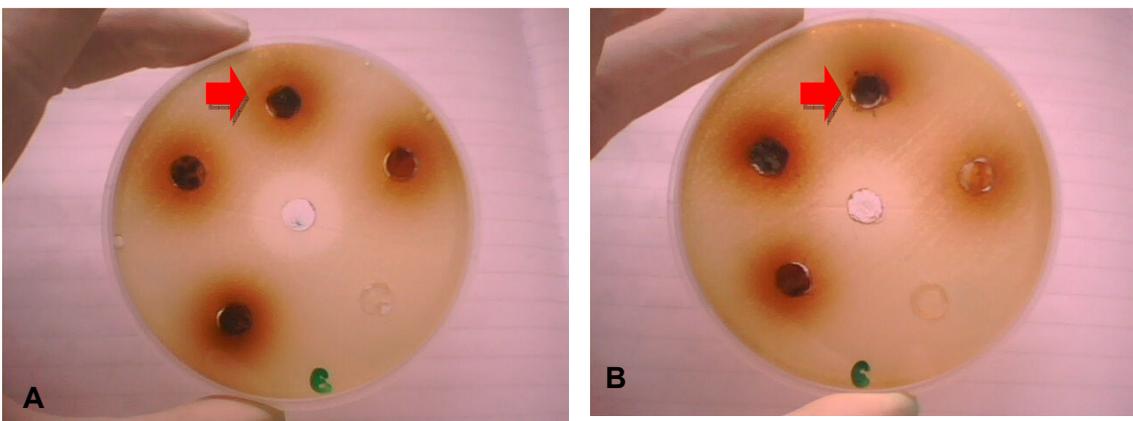


FIGURA 35 - Teste antimicrobiano contra *E. coli*. A: *Penicillium* spp. 1 AFL 0 em BDAA (seta vermelha) com inibição de 2,5 mm de diâmetro. B: *Penicillium* spp. 1 AFL 0 em SBRA (seta vermelha) com inibição de 2,5 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

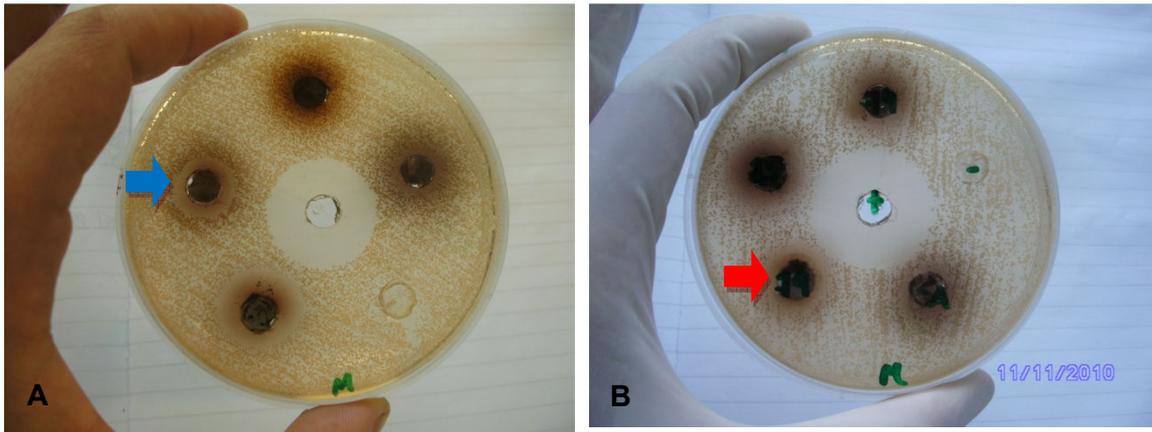


FIGURA 36 - Teste antimicrobiano contra MRSA. A: *Acremonium* spp. AFL SEMENTE em SBRA (seta azul) com inibição de 2,5 mm de diâmetro. B: *Aspergillus* spp. AFS 28 em BDAA (seta vermelha) com inibição de 3,5 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

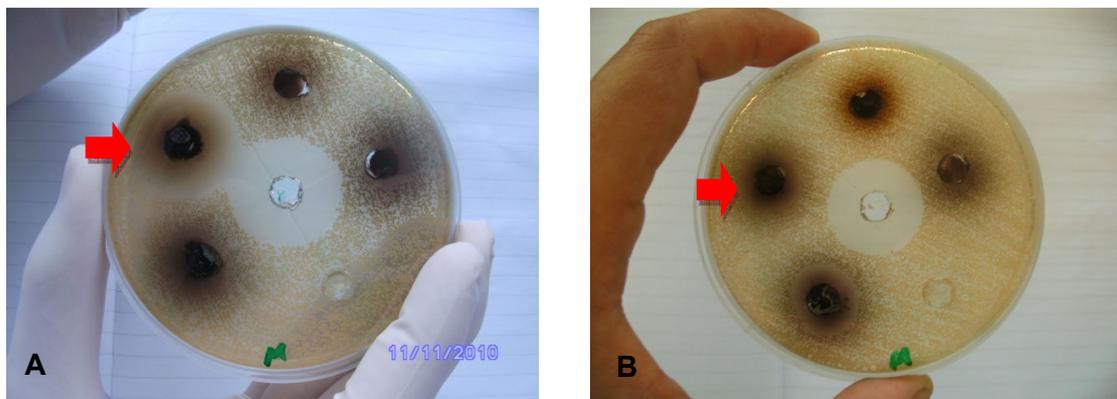


FIGURA 37 - Teste antimicrobiano contra MRSA A: *Aspergillus* spp. AFS 28 em SBRA (seta vermelha) com inibição de 11 mm de diâmetro. B: *Acremonium* spp. AFL SEMENTE em BDAA (seta vermelha) com inibição de 3 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

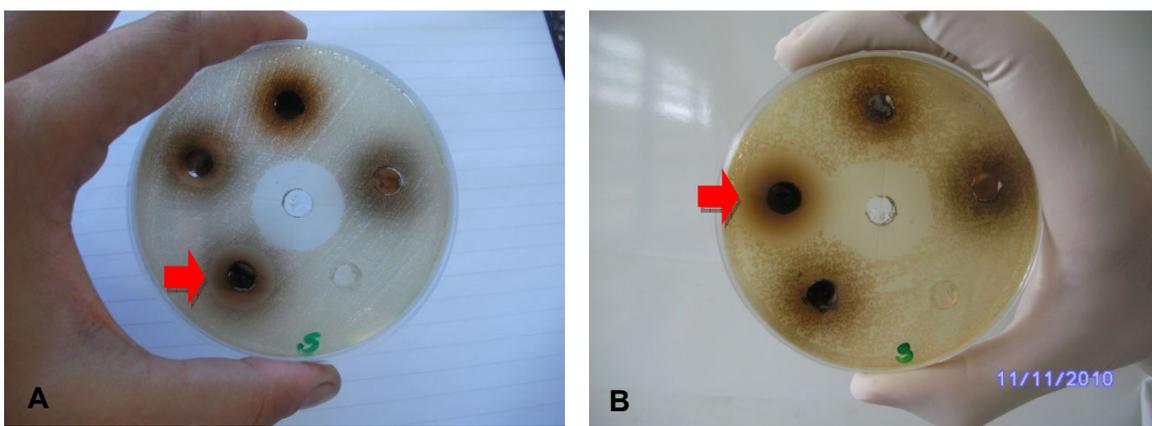


FIGURA 38 - Teste antimicrobiano contra *S. aureus*. A: *Aspergillus* spp. AFS 28 em BDAA (seta vermelha) com inibição de 1,5 mm de diâmetro. B: *Aspergillus* spp. AFS 28 em SBRA (seta vermelha) com inibição de 10 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

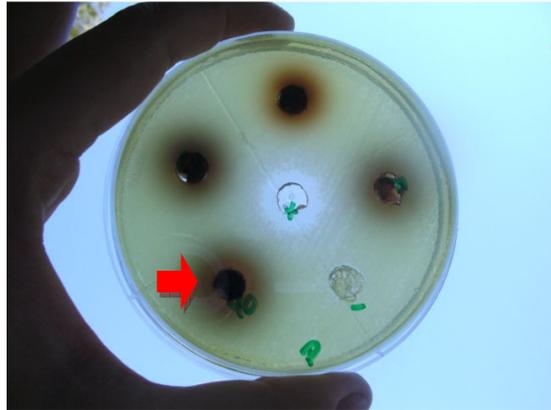


FIGURA 39 - Teste antimicrobiano contra *P. aeruginosa*. *Penicillium* spp. 1 AFL 0 em BDAA (seta vermelha) com inibição de 0,5 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

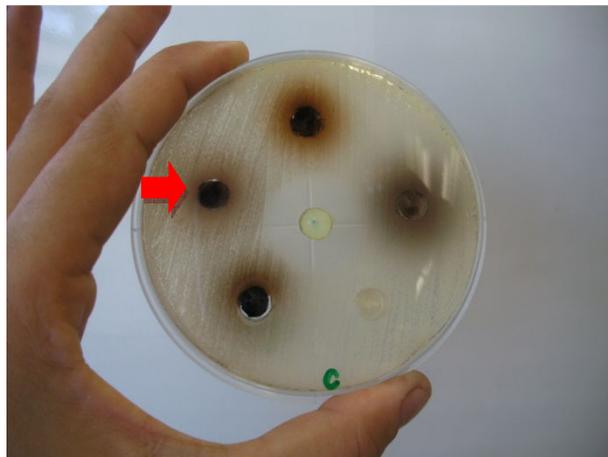


FIGURA 40 - Teste antimicrobiano contra *C. albicans*. *Acremonium* spp. AFL SEMENTE em SBRA (seta vermelha) com halo de 2 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

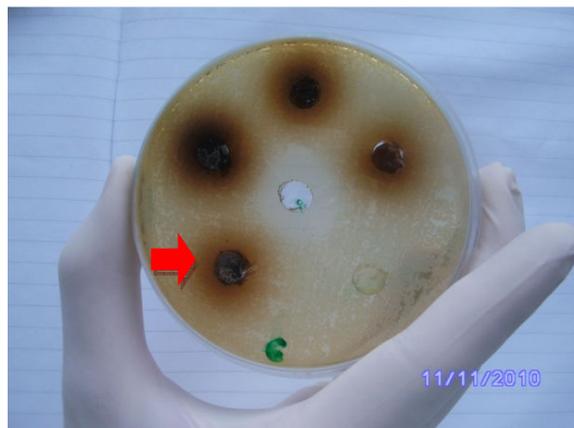


FIGURA 41 - Teste antimicrobiano contra *E. coli*. *Aspergillus* spp. AFS 28 em BDAA (seta vermelha) com inibição de 2 mm de diâmetro. Fonte: Autor, 2010.

QUADRO 09 - Comparação dos resultados dos testes antimicrobianos de fungos endofíticos e epifíticos isolados de *E. edulis*, cultivados em meio BDA, meio Sabouraud, meio BDA ou meio Sabouraud acrescido de extrato hidroalcolico dos frutos (BDAA e SBRA, respectivamente), por 7 dias a 28° C.

CEPAS INIBIDAS NO TESTE POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR				
FUNGOS MEIOS DE CULTURA	MEIO BDA	MEIO BDAA	MEIO SBR	MEIO SBRA
<i>Penicillium</i> spp. 1 (AFL 0)	<i>S. aureus</i> (5 a 6 mm), MRSA (2 a 6 mm)	<i>S. aureus</i> (8 mm), <i>E. coli</i> (10 mm), <i>P. aeruginosa</i> (1 mm), <i>C. albicans</i> (2 a 4 mm), MRSA (10mm)	MRSA (4 mm)	<i>S. aureus</i> (10 mm), <i>E. coli</i> (10 mm), <i>C. albicans</i> (4 a 6 mm), MRSA (11 mm)
<i>Penicillium</i> spp. 2 (AFL 1)	<i>S. aureus</i> (4 a 5 mm)	S.I.	S.I.	<i>S. aureus</i> (4 mm)
<i>Trichoderma</i> spp. (AFL 10)	<i>S. aureus</i> (8 a 10 mm)	S.I.	<i>S. aureus</i> (6 a 10 mm), MRSA (12 a 16 mm)	S.I.
<i>Mycelia sterilia</i> 2 (AFL 5B)	<i>S. aureus</i> (4 a 6 mm)	S.I.	S.I.	S.I.
<i>Acremonium</i> spp. (AFL SEMENTE)	MRSA (2 a 3 mm)	MRSA (3 a 5 mm)	S.I.	<i>S. aureus</i> (4 mm), <i>C. albicans</i> (4 a 6 mm), MRSA (5 mm)
<i>Penicillium</i> spp. 4 (AFS 2)	S.I.	S.I.	<i>C. albicans</i> (10 mm)	<i>S. aureus</i> (4 a 6 mm), MRSA (6 a 8 mm)
<i>Alternaria</i> spp. (AFS 20B)	<i>S. aureus</i> (8 a 12 mm), MRSA (10 mm)	S.I.	S.I.	S.I.
<i>Aspergillus</i> spp. (AFS 28)	<i>S. aureus</i> (12 a 16 mm), MRSA (8 a 10 mm)	<i>S. aureus</i> (2 mm), <i>E. coli</i> (4 mm), <i>C. albicans</i> (2 mm), MRSA (6 a 8 mm)	MRSA	<i>S. aureus</i> (20 mm), MRSA (24 mm)

;Legenda: BDA = Meio Batata Dextrose Ágar, BDAA = Meio BDA Acrescido De Extrato Hidroalcolico D~e *E. edulis*, SBR = Meio Sabouraud, SBRA = Meio Sabouraud Acrescido De Extrato Hidroalcolico De *E. edulis* AFL = "Açaí" Fruto Limpo, AFS = "Açaí" Fruto Sujo, MRSA: *S. aureus* Meticilina Aminoglicosídeo Resistente. A medida em mm refere-se ao comprimento do diâmetro do halo de inibição. S.I. : Sem Inibição. Fonte: Autor, 2010.

Em princípio, pode-se sugerir que a presença do extrato hidroalcolico do fruto atua de 3 maneiras nos resultados nestes testes.

A primeira hipótese seria que o meio de cultura modificado leva o fungo a uma outra via metabólica antes não ativa, que produz um princípio ativo diferente do primeiro, que foi testado antes, o que levaria a apresentar atividade contra cepas que anteriormente não conseguira inibir (SURYANARAYANAN *et al.* 2009).

Outra possibilidade seria de que estes compostos participam da via metabólica inicial, sendo utilizados pelo fungo em seu desenvolvimento. Seu acréscimo ao meio provocou o aumento da produção dos princípios ativos, levando a uma maior disponibilidade (HOFFMEISTER e KELLERB 2006).

A terceira alternativa seria que a ausência dos compostos da polpa dos frutos leva o fungo a produzir os compostos ativos. Estando o substrato parecido com o ambiente original do fungo (a polpa), o micro-organismo pára de produzir o metabólito ativo (LUSHCHAK 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo podem vir da interação com extrato oriundo da planta hospedeira. As relações ecológicas entre fungo endofítico e suas respectivas plantas hospedeiras são muito complexas. O tipo de interação entre o endófito e uma planta é controlado pelos genes de ambos os organismos e modulada pelo ambiente. Uma mudança no ambiente do endófito também implica em uma mudança em seu perfil metabólico. Um ambiente hostil ou mais próximo ao ambiente natural pode contribuir para o aumento da capacidade de síntese dos endofíticos. Isso talvez explique a aparente variação observada quando uma espécie de endófito isolado de uma planta hospedeira produz um composto bioativo, mas não consegue fazê-lo quando isolados em outra espécie de planta ou em um meio de cultura padrão (LI *et al.* 1996 *apud* SURYANARAYANAN *et al.* 2009). Isso significa que a planta hospedeira influencia a capacidade sintética de um endófito. Fungos endofíticos são mais propensos a apresentar um grau de especificidade em relação a seus hospedeiros, do que em relação aos fungos que podem ser isolados da superfície exterior. Considerando isto a regra, então endófitos podem manifestar a sua atividade antimicrobiana - ou produzir metabólitos secundários notáveis - só na presença de indutores ou substratos de onde habitam (HOFFMEISTER e KELLERB 2006). Estudos anteriores mostraram que tanto a taxa de crescimento de fungos endofíticos em cultura, quanto às interações interespecíficas *in vitro*, podem ser alterados repetidamente, incluindo extratos de plantas diferentes em meios de cultivo (ARNOLD 2007). EZRA e STROBEL (2003) avaliaram a resposta do fungo *Muscodor albus* em testes antimicrobianos e relatam respostas diferenciadas devido

a modificações no meio de cultura, com aumento de compostos voláteis como metil isobutilketona, ácido acético e butil éster, e até a produção de novos produtos, como ácido propanóico, 2-metil-butil éster, 3 metil-butil éster, que também apresentavam atividade. Isso mostra uma relação entre a composição dos nutrientes do meio de crescimento e da diversidade de compostos orgânicos voláteis detectada. O mesmo ocorreu com *Fusarium* em relação a ácido siálico, peroxidação lipídica e outras alterações, inclusive a nível enzimático (KAYALI e TARHAN 2006), e em diversos fungos filamentosos e leveduras com relação ao pH (PENALVA E ARST, JR. 2002). O contrário também ocorre: plantas passam a produzir compostos diferentes na ausência ou presença de endófitos (MUCCIARELLI *et al.* 2007 e JALLOW *et al.* 2008 *apud* SURYANARAYANAN *et al.* 2009). Todos os metabólitos secundários comuns são derivados de relativamente poucos precursores primários, e condições que afetam a disponibilidade desses precursores podem afetar a produção de certas classes de metabólitos (HOFFMEISTER e KELLERB 2006).

Sugere-se que a adaptação em longo prazo e co-evolução dos endófitos levam à produção de um mesmo composto que a planta hospedeira. Esta descoberta fornece uma evidência significativa de que endófitos produzem metabólitos semelhantes ou iguais aos da planta hospedeira (XU *et al.* 2009). No entanto, não parece se aplicar ao presente estudo, pois os extratos oriundos da planta não possuem atividade, o que indica que o processamento no metabolismo do fungo leva a alterações na atividade antimicrobiana. Esta evidência pode ser sugerida ao gênero *Acremonium* spp. isolado da semente que absorveu componentes do meio modificado, alterando sua cor (de branco para rosado), e apresentando alterações em sua atividade nos testes.

No presente estudo, o substrato dos fungos (com o extrato da polpa), com presença de diversos compostos, poderia estar regulando a expressão gênica e as vias enzimáticas do metabolismo fúngico. A interação dos fungos endófitos com sua planta hospedeira, seja estrutural, fisiologicamente ou ao nível de agrupamentos gênicos, é notável. O exemplo mais conhecido de uma ligação genética entre a produção de antibióticos e desenvolvimento morfológico é encontrado em bactérias endófitas e *Streptomyces* spp., em que os elementos comuns que regulam a esporulação e produção de antibióticos têm sido relatados (CALVO *et al* 2002).

Genes contendo todas ou a maioria das informações necessárias para biossíntese do produto natural são mantidos ao longo da evolução e

expressos/suprimidos porque o princípio natural traz vantagens para o organismo produzir (CALVO *et al.* 2002). O número de agrupamentos de genes supostamente dedicado ao metabolismo secundário e o sequenciamento do genoma revelado, por muitas vezes, ultrapassa o número de compostos conhecidos a partir de uma determinada espécie de agora, como é evidente a partir do genoma do *Fusarium graminearum* (HOFFMEISTER e KELLERB 2006). Ensaio com vários fungos endófitos cultivados juntos em condições *in vitro*, uso de marcadores moleculares e técnicas utilizando cDNA proporcionariam alguns esclarecimentos sobre isso, levando à elaboração de procedimentos para obtenção de melhor rendimento dos metabólitos de interesse (SURYANARAYANAN *et al.* 2009). Evidências para apoiar a existência de qualquer ligante ou silenciador importante na ativação de formação do produto natural apresenta uma meta empolgante para o futuro em estudos no campo da regulação do metabolismo fúngico (HOFFMEISTER e KELLERB 2006).

6. CONCLUSÕES

1. A quantificação da umidade, sólidos solúveis totais, lipídeos, proteínas, resíduo mineral fixo (cinzas) e sais minerais da polpa, da casca das sementes e das sementes dos frutos de *E. edulis* foram determinadas, apresentando teores diferenciados em relação a *E. oleracea* quanto a quantidade de ácidos graxos.

2. A forma de extração de compostos dos frutos, bem como a extração de óleos das sementes de *Euterpe edulis*, foi otimizada.

3. Não há ação inibitória do extrato e do óleo contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.

4. Foram isolados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Mycelia sterilia*.

5. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Mycelia sterilia*, selecionados para teste antimicrobiano, apresentam ação inibitória contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 e MRSA.

6. Ocorrem variações na atividade antimicrobiana observada nos fungos de acordo com o meio de cultura (BDA ou Sabouraud), podendo ter ação inibitória dependente do meio utilizado.

7. Há alterações na ação antimicrobiana dos fungos testados em condições de crescimento diferenciado, por adição do extrato hidroetanólico dos frutos ao meio de cultura BDA ou Sabouraud, sendo que alguns fungos apresentam inibição da atividade antimicrobiana, outros apresentaram alteração do diâmetro do halo de inibição e alguns fungos demonstraram atividade antimicrobiana de alguns fungos contra cepas que anteriormente não inibira.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo abre uma gama de possibilidades nas áreas de Micologia, Bioquímica e Bromatologia.

Para a análise dos frutos, um detalhamento e refinamento nas técnicas na identificação dos compostos, sobretudo para os lipídeos das cascas e das sementes, além de comparações destes fatores em frutos colhidos em diversas estações e locais. Também há possibilidade de o extrato de *E. edulis*, que não obteve resultado antimicrobiano, poder apresentar outras atividades biológicas interessantes, como antitumoral, gastroprotetora, vasoprotetora, entre outras, assim como em *E. oleracea*. É necessário um estudo detalhado de descrição bioquímica para saber o que realmente compõe o composto. A metodologia de extração pode acarretar em alterações importantes, que merecem mais atenção em pesquisas futuras.

Os fungos encontrados no presente estudo podem ser identificados em gênero e espécie por técnicas moleculares. Também se faz necessário o isolamento de fungos de caule, folhas, raízes de *E. edulis*, e do solo circundante, para análise da transmissão dos esporos. Isso deverá ser feito em diferentes épocas do ano, e em diversos ambientes de cultivo, além de isolados das espécies irmãs e de outras palmeiras do mesmo local.

Para a atividade antimicrobiana dos fungos, a pesquisa visando o isolamento do princípio ativo seria um passo inicial para produção em larga escala. Usando técnicas moleculares, pode-se verificar onde, dentro do genoma da espécie, estão os genes que provavelmente regulam a produção do composto. Também pode-se verificar de que forma o extrato atua sobre o metabolismo destes organismos, e como os genes regulam sua resposta.

Mais estudos interdisciplinares com esta planta podem não apenas mostrar novas possibilidades industriais ou farmacêuticas, mas, sobretudo estimular a exploração sustentável deste espécime.

REFERÊNCIAS

- ALBARICI T. R., VALETA A. C., PESSOA J. D. C. *Efeito da temperatura nas antocianinas do açai*. Comunicado Técnico Embrapa ISSN 1517-4786, São Carlos, SP. Outubro de 2007.
- AMBIENTE BRASIL. *Palmito juçara (Euterpe edulis), silvicultura de palmito juçara (Euterpe edulis)*. Acesso pelo site <http://www.ambientebrasil.com.br>. em 20/10/2010.
- ARAUJO C. L., BEZERRA I. W. L., DANTAS I. C., LIMA T. V. S., OLIVEIRA A. S., MIRANDA M. R. A., LEITE E. L., SALES M. P. *Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits*. Food Chemistry, 85: 107–110, 2004.
- ARNOLD A. E. *Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers*. Fungal biology reviews, 21: 51–66, 2007.
- ARNOLD A. E., MAYNARD Z., GILBERT G. S. *Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity*. Mycology Research, 105 (12): 1502-1507, 2001.
- AZEVEDO J. L. *Botânica: uma ciência básica ou aplicada?*. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, 22 (2): 225-229, 1999.
- BAYDAR N. G., OZKAN G., SAGDIC O. *Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitis vinifera L.) extracts*. Food Control, 15, 335–339, 2004.
- BENKENDORFF K., DAVIS A. R., ROGERS C. N., BREMNER J. B. *Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 316: 29–44, 2005.
- BOBBIO F. O., DRUZIAN J. I., ABRÃO P. A.; BOBBIO P. A., FADELLI S. *Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açazeiro (Euterpe oleracea) Mart*. Ciências e Tecnologia Alimentos, 20 (3), 2000.
- BORGES G. S. C., VIEIRA F. G. K., COPETTI C., GONZAGA L. V., ZAMBIAZI R. C., FILHO J. M., FETT R. *Chemical characterization, bioactive compounds and antioxidant capacity of jussara (Euterpe edulis) fruit from the atlantic forest in southern brazil*. Food Research international, *In press*, 2010.
- BRITO E. S., ARAÚJO M. C. P., ALVES R. E., CARKEET C., CLEVIDENCE B. A., NOVOTNY J. A. *Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru*. Journal Agriculture Food Chemistry, 55: 9389–9394, 2007.
- CALVO A. M., WILSON R. A., BOK J. W., KELLER N. P. *Relationship between secondary metabolism and fungal development*. Microbiology And Molecular Biology Reviews, 9: 447–459, 2002.
- COÏSSON J. D.; TRAVAGLIA F.; PIANA G.; CAPASSO M.; ARLORIO M. *Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt*. Food Research International, 38: 893–897, 2005.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. 2ª edición. New York Botanical Garden, Bronx. 1988 *apud* CK AGRÍCOLA 2008.

- CUSHNIE T. P. T., LAMB A. J. *Antimicrobial activity of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, 26: 343–356, 2005.
- DEHARO E. BAELEMANS R.; GIMENEZ A.; QUENEVO C., BOURDYA G. *In vitro Immunomodulatory activity of plants used by the tacana ethnic group in bolivia*. PhytoMedicine, 11, 516–522, 2004.
- DESMARCHELIER C., MONGELLI, E., COUSSIO, J. e CICCIA G. *Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas*. Journal of Ethnopharmacology 50: 91-96, 1996.
- DEUSCHLE, R. A. N., CAMARGO, T. DE, ALVES, S. H., MALLMANN, C. A., HEIZMANN, B. M. *Fracionamento do extrato diclorometânico de Senecio desiderabilis Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana*. Revista Brasileira de Farmacognosia 17(2): 220-223, 2007.
- DI STASI, L. C., OLIVEIRA, G. P., CARVALHAES, M. A., QUEIROZ-JUNIOR, M., TIEN, O. S., KAKINAMI, S. H., REIS, M. S. *Medicinal plants popularly used in the brazilian tropical atlantic forest*. Fitoterapia, 69-91, 2002.
- EMBRAPA FLORESTAS. *Climas*. Acesso pelo site <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/clima.htm> em 17/10/2010.
- EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. *Sistemas de Produção de Açaí*. Acesso pelo site <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai/paginas/intro.htm> em 18/04/2011.
- ESQUENAZI D., WIGG M. D., MIRANDA M. M. F. S., RODRIGUES H. M., TOSTES J. B. F., ROZENTAL S., DA SILVA A. J. R., ALVIANO C. S. *Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from Cocos nucifera Linn. (Palmae) husk fiber extract*. Research in Microbiology , 153: 647–652, 2002.
- EZRA D., STROBEL G. A. *Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by Muscodor albus*. Plant Science, 165: 1229–1238, 2003.
- FANTINI, A. C., RIBEIRO, R. J. e GURIES, R. P. *Produção de Palmito (Euterpe edulis Martius – Arecaceae) na Floresta Ombrófila Densa: potencial, problemas e possíveis soluções*. In *Euterpe edulis Martius - (palmito) - Biologia, Conservação e Manejo*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 256-280, 2000.
- FIGUEREDO M. J. M., FERREIRA T. A., SILVA A. R. Z., HELM C. V., HANSEL F. A. *Metodologia para obtenção de antocianinas de frutos de juçara (Euterpe edulis)*. Comunicado Técnico Embrapa ISSN 1517-5030, Colombo, PR, Dezembro, 2008.
- FLORIANO, E. P., NODARI, R. O., REIS A., REIS, M. S., GUERRA, M. P. *Manejo do palmito: uma proposta*. Documentos EMBRAPA/CNPF (19): 189-91, 1988.
- FROHLICH J., HYDE K. D., PETRINI O. *Endophytic fungi associated with palms*. Mycology Research, 104 (10): 1202-1212, 2000.
- FURTADO N. A. J. C., SAID S., ITO I. Y., BASTOS J. K. *The antimicrobial activity of Aspergillus fumigatus is enhanced by a pool of bacteria*. Microbiology Research, 157: 207–211, 2002.
- GALLARDO G. L., BUTLER M., GALLO M. L., RODRIGUEZ M. A., EBERLIN M. N., CABRERA G. M. *Antimicrobial metabolites produced by an intertidal Acremonium furcatum*.

Phytochemistry, 67: 2403–2410, 2006.

GALOTTA A. L. Q. A., BOAVENTURA M. A. D. *Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (Euterpe precatoria Mart., Arecaceae)*. Quimica Nova, 28(4): 610-613, 2005.

GRANGE J. M. e DAVEY R. W. *Antibacterial properties of própolis (bee glue)*. Journal Research Society Medicine 83: 159-160, 1990.

GURIB-FAKIM A. *Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow*. Molecular Aspects of Medicine, 27: 1–93, 2006.

HENDERSON A. *The genus Euterpe in Brasil. In Euterpe edulis Martius - (palmiteiro) - Biologia, Conservação e Manejo*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1-22, 2000.

HOFFMEISTER D. E KELLERB N. P. *Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation*. Journal of Natural Products, 24: 393–416, 2007.

HOGAN S., CHUNG H., ZHANG L., LI J., LEE Y., DAÍ Y., ZHOU K. *Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açaí*. Food Chemistry, 118: 208–214, 2010.

HOOG, S., J. GUARRO, J. GENÉ, e M. J. FIGUEIRAS. *Atlas of Clinical Fungi - Versão 2004.11*, 2004.

HUANG C. B., GEORGE B., EBERSOLE J. L. *Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms*. Archives of oral biology, 55: 555–560, 2010.

HUANG C., CHEN C., PORNATTANANANGKUL D., ZHANG L., CHAN M., HSIEH M., ZHANG L. *Eradication of drug resistant Staphylococcus aureus by liposomal oleic acids*. Biomaterials, 32: 214-221, 2011.

HUSSAIN H., KROHN K., ULLAH Z., DRAEGER S., SCHULZ B. *Bioactive chemical constituents of two endophytic fungi*. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 898-900, 2007.

HYDE K. D. e SOYTONG K. *The fungal endophyte dilemma*. Fungal Diversity 33: 163–173, 2008.

IADEROZA, M., BALDINI, V.L.S., DRAETTA, S. E. , BOVI, M. L. A. *Anthocyanins from fruits of açaí (Euterpe oleracea, Mart) and juçara (Euterpe edulis Mart)*. Tropical Science, 32: 41-46, 1992.

INBIOVERITAS PROJECT. *Euterpe edulis Martius*. Acesso por <http://www.inbioveritas.net/index.php?Auswahl=http://www.palmito-info.net>, em 17/02/2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

JALLOW M. F. A., DUGASSA-GOBENA D., VIDAL S. *Influence of an endophytic fungus on host plant selection by a polyphagous moth via volatile spectrum changes*. Arthropod–Plant Interactions 2: 53–62, 2008.

KANG J., LI Z., WU T., JENSEN G. S., SCHAUSS A. G., WU X. *Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (Euterpe oleracea Mart.)*. Food Chemistry, 122: 610–617, 2010.

- KAYALI H. A., TARHAN L. *The relationship between the levels of total sialic acid, lipid peroxidation and superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, ascorbate antioxidant in urea supplemented medium by Fusarium species*. Enzyme and Microbial Technology, 39: 697–702, 2006.
- KERN, M. E. e BLEVINS, K. S. *Micologia Médica*. 2ª ed. São Paulo: Ed. Premier, 256, 1999.
- LARKINS, N. e WYNN, S. *Pharmacognosy: phytomedicines and their mechanisms*. The Veterinary Clinics Small Animals, 34, 291–327, 2004.
- LEE R. e BALICK M. J. *Palms, people, and health*. Explore, 4-1, 59, 2008.
- LI J. Y., STROBEL G. A., SIDHU R., HESS W. M., FORD E. J. *Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, Taxodium distichum* Microbiology, 142: 2223–2226, 1996.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1992.
- LUSHCHAK, V. I., *Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals*. Comparative Biochemistry and Physiology. In press, 2010.
- MAC FADDEN, J. *A produção de açaí a partir do processamento dos frutos do palmito (Euterpe edulis Martius) na mata atlântica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005, 7-11.
- MANTOVANI A. e MORELLATO P. *Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos de biologia floral. In Euterpe edulis Martius - (palmito) - Biologia, Conservação e Manejo*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 23-38, 2000.
- MARÇO P. H., POPPI R. J. *Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais*. Quimica Nova, 31 (5): 1218-1223, 2008.
- MATHEUS M. E.; FERNANDES S. B. O.; SILVEIRA C. S.; RODRIGUES V. P.; MENEZES F. S.; FERNANDES P. D. *Inhibitory effects of Euterpe oleracea Mart. on nitric oxide production and inos expression*. Journal of Ethnopharmacology, 107, 291–296, 2006.
- MENEZES, E. M. S., TORRES, A. T. e SRUR, A. U. S. *Lyophilized açaí pulp (Euterpe oleracea, Mart.) nutritional value*. Acta Amazonica 38(2), 311 – 316, 2008.
- MUCCIARELLI M., CAMUSSO W., MAFFEI M., PANICCO P., BICCHI C. *Volatile terpenoids of endophyte-free and infected peppermint (Mentha piperita L.): chemical partitioning of a symbiosis*. Microbial Ecology 54: 685–696, 2007.
- NAZARÉ, R. F. R.; OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U. *Avaliação de progênies de açaizeiro como fonte de corantes naturais para alimentos*. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17. 2002, Belém, PA. Anais. Belém, PA: SBF, 2002.
- OKEKE M. I., IROEGBU C. U., EZE E. N., OKOLI A. S., ESIMONE C.O. *Evaluation of extracts of the root of Landolphia owerrience for antibacterial activity*. Journal of Ethnopharmacology, 78: 119–127, 2001.
- OSTROSKY E. A., MIZUMOTO M. K., LIMA M. E. L., KANEKO T. M., NISHIKAWA S. O., FREITAS B. R. *Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais*. Brazilian Journal

Pharmacognosis, 18(2), Abr./Jun, 2008.

OWNLEY B. H.; GRIFFIN M. R.; KLINGEMAN W. E.; GWINN K. D.; MOULTON J. K.; PEREIRA R. M. *Beauveria bassiana: endophytic colonization and plant disease control*. Journal of Invertebrate Pathology, 98, 267–270, 2008.

PACHECO-PALENCIA L. A., DUNCAN C. E., TALCOTT S. T. *Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, Euterpe oleracea and Euterpe precatoria*. Food Chemistry, 115: 1199–1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA L. A., HAWKEN P., TALCOTT S. T. *PHYTOCHEMICAL, Antioxidant and pigment stability of açai (Euterpe oleracea Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage*. Food Research international, 40: 620–628, 2007.

PACHECO-PALENCIA L. A., MERTENS-TALCOTT S. U., TALCOTT S. T. *In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açai fruit (Euterpe oleracea Mart.)*. Food Chemistry, 119: 1071–1078, 2010.

PACHECO-PALENCIA L. A., MERTENS-TALCOTT S., TALCOTT S. T. *Chemical composition, antioxidant properties and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (Euterpe oleracea Mart.)*. Journal Agriculture Food Chemistry, 56, 4631–4636, 2008.

PANZA V., PIGHIN D., LÁINEZ V., POLLERO R. J., MALDONADO S. *Storage lipids and proteins of Euterpe edulis seeds*. Biocell, 33(2): 99-106, 2009.

PATEL, J. M. *A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids*. Lethbridge Undergraduate Research Journal. 3 (2), 2008.

PELAEZ F., COLLADO J., ARENAL F., BASILIO A., CABELLO A., MATAS M. T. D. , GARCIA J. B., GONZALEZ DEL VAL A., GONZALEZ V., GORROCHATEGUI J., HERNANDEZ P., MARTIN I., PLATAS G., VICENTE F. *Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity*. Mycology Research, 102 (6) : 755-761, 1998.

PENALVA M. A. e ARST, JR. H. N. *Regulation of gene expression by ambient ph in filamentous fungi and yeasts*. Microbiology and molecular biology reviews, 66: 426–446, 2002.

PEREIRA, J. O., AZEVEDO, J. L. E PETRINI, O. *Endophytic fungi of Stylosanthes : A first report*. Mycologia 85: 362-364, 1993.

PEREIRA N. S., MONTE A. F. G., REIS A., MORAIS P. C., SALES M. J. A. *Luminescence and energy transfer from açai oil in polystyrene matrix*. Optical Materials, 32: 1134–1138., 2010.

PEREIRA, L. B. *A economicidade do palmitheiro (Euterpe edulis Martius) sob manejo em regime de rendimento sustentado*. In *Euterpe edulis Martius - (palmitheiro) - Biologia, Conservação e Manejo*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 225-241, 2000.

PERRUCHON S. *Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura*. Cosmetics e Toiletries 14: 74, 2002.

PLOTKIN, M. J.; BALICK, J. *Medicinal uses of south american palms*. Journal of Ethnopharmacology, 10, 157-179, 1984.

PRETTO J. B. *Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UNIVALI, Setembro, 4-27, 2005.

PUUPPONEN-PIMIA R., NOHYNEK L., MEIER C., ÈNEN M. K. E., HEINONEN M. , HOPIA A., OKSMAN-CALDENTY K. M. *Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries*. Journal of Applied Microbiology, 90, 494-507, 2001.

REIS M. S.; CONTE R.; NODARI R. O.; FANTINI A. C.; REIS A.; MANTOVANI A.; MARIOT A. *Manejo sustentável do palmito. In Euterpe edulis Martius - (palmito) - Biologia, Conservação e Manejo*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 202-224, 2000A.

REIS M. S.; GUERRA M. P.; NODARI R. O.; REIS A.; RIBEIRO R. J. *Distribuição geográfica e situação atual das populações na área de ocorrência de Euterpe edulis Martius*. In *Euterpe edulis Martius - (palmito) - Biologia, Conservação e Manejo*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 324-335, 2000B.

REIS, A. e KAGEYAMA, P. Y. *Dispersão de sementes do palmito (Euterpe edulis Martius - Palmae)*. In *Euterpe edulis Martius - (palmito) - Biologia, Conservação e Manejo*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 60-92, 2000.

REIS, A.; REIS, M. S. DOS e FANTINI, A. C. *Manejo de rendimento sustentado de Euterpe edulis*. São Paulo: USP, 1993.

RIBEIRO, J. C., ANTUNES L. M. G., AISSA A. F., DARIN J. D. C., DE ROSSO V. V., MERCADANTE A. Z., BIANCHI M. L. P. *Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (Euterpe oleracea Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay*. Mutation Research, 695: 22–28, 2010.

RÍOS J. L. e RECIO M. C. *Medicinal plants and antimicrobial activity*. Journal of Ethnopharmacology, 100: 80–84, 2005.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K. e TYLER V. E. *Farmacognosia e biotecnologia*. 1-15, 157, 158. 1997.

ROCHA A.P.M.; CARVALHO L.C.R.M.; SOUSA M.A.V.; MADEIRA S.V.F.; SOUSA P.J.C.; TANO T.; SCHINI-KERTH V.B.; RESENDE A.C.; SOARES DE MOURA R. *Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat*. Vascular Pharmacology, 46, 97–104, 2007.

ROCHA P.A.F. *Preservantes*. Cosmetics e Toiletries 6: 26 – 33, 1994.

RODRIGUES K. F. *The foliar fungal endophytes of the amazonian palm Euterpe oleracea*. Mycologia, 86: 376-385, 1994.

RODRIGUES R. B., LICHTENTHALER R., ZIMMERMANN B. F., PAPAGIANNPOULOS M., FABRICIUS H., MARX F. *Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (Acai) seeds and identification of their polyphenolic compounds*. Journal Agriculture Food Chemistry, 54: 4162–4167, 2006.

ROGEZ, H. *Açai: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação*. Belém (Brazil): Edufpa, 2000.

ROJAS R.; BUSTAMANTE B.; BAUER J.; FERNÁNDEZ I.; ALBÁN J.; LOCK O.

Antimicrobial activity of selected peruvian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 88, 199–204, 2003.

ROSSO, V. V., HILLEBRAND, S., MONTILLA, E. C., BOBBIO, F. O., WINTERHALTER, P., MERCADANTE, A. Z. *Determination of anthocyanins from acerola (Malpighia emarginata DC.) and açai (Euterpe oleracea Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS.* Journal of Food Composition and Analysis, 21, 291–299, 2008.

SANTO A. P. E., SILVA R. C., SOARES F. A. S. M., ANJOS D., GIOIELLI L. A., OLIVEIRA M. N. *Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt.* International Dairy Journal, 20: 415–422, 2010.

SCAZZOCCHIO F., D'AURIA F.D., ALESSANDRINI D., PANTANELLA F. *Multifactorial aspects of antimicrobial activity of própolis.* Microbiological Research 161: 327 – 333, 2006.

SCHAUSS A. G., CLEWELL A., BALOGH L., SZAKONYI I. P., FINANCSEK I., HORVÁTHD J., THUROCZY J., BÉRES E., VÉRTESI A., HIRKA G. *Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (Monavie Active®).* Toxicology, *In press*, 2010.

SCHAUSS A. G., WU X., PRIOR R. L., OU B., HUANG D., OWENS J., AGARWAL A., JENSEN G. S., HART A. N., SHANBROM E. *Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, Euterpe oleracea Mart. (Acai).* Journal Agriculture Food Chemistry, 2006, 54, 8604–8610, 2006A.

SCHAUSS A. G., WU X., PRIOR R. L., OU B., PATEL D., HUANG D., KABABICK J. P. *Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, Euterpe oleracea Mart. (Acai).* J. Agric. Food Chem., 54: 8598–8603, 2006B.

SCHULTZ J. *Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açais de Euterpe edulis Martius e Euterpe oleracea Martius submetidos a tratamentos para sua conservação.* Trabalho de Conclusão de Curso. Florianópolis, junho de 2008.

SILVA, M. G. P. C.; BARRETTO, W. S.; SERÔDIO, M. H. *Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açai.* In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Florianópolis, Santa Catarina, 22 a 26 de novembro de 2004.

SILVA, E. M., SOUZA, J. N. S., ROGEZ, H., REES, J. F., LARONDELLE, Y. *Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the amazonian region.* Food Chemistry 101,1012–1018, 2007.

SOSNOWSKA J. e BALSLEV H. *American palm ethnomedicine: a meta-analysis.* Journal of Ethnobiology and EthnoMedicine, 5 (43), 2009.

SOUZA M. O., SILVA M., SILVA M. E., OLIVEIRA R. P., PEDROSA M. L. *Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats.* Nutrition, 26: 804–810, 2010.

SOVAK M. *Grape Extract, Resveratrol and Its Analogs: A Review.* Journal Of Medicinal Food, 4 (2), 2001.

STONE J. K., POLISHOOK J. D., WHITE JR. J. F. *Endophytic fungi: Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods,* 241-270, 2004.

SUN X., SEEBERGER J., ALBERICO T., WANG C., WHEELER C. T., SCHAUSS A. G., ZOU S. *Açai palm fruit (Euterpe oleracea MART.) pulp improves survival of flies on a high fat diet.* Experimental Gerontology, 45: 243–251, 2010.

SURYANARAYANAN T. S.; THIRUNAVUKKARASU N.; GOVINDARAJULU M. B.; SASSE F.; JANSEN R.; MURALI, T. S. *Fungal endophytes and bioprospecting*. Fungal biology reviews, 23, 9–19, 2009.

TSUKAMOTO FILHO, A. A., MACEDO, R. L. G., VENTURIN, N., MORAIS, A. R. *Aspectos fisiológicos e silviculturais do palmito (Euterpe edulis Martius) plantado em diferentes tipos de consórcios no município de lavras, MG*. Revista Cerne 7(1). 2001.

VIZCAINO J. A., SANZ L., BASILIO A., VICENTE F., GUTIERREZ S., HERMOSA M. R., MONTE E. *Screening of antimicrobial activities in trichoderma isolates representing three Trichoderma sections*. Mycology Research, 109 (12): 1397–1406, 2005.

WALLE, T. *Absorption and metabolism of flavonoids*. Free Radical Biology e Medicine, 36(7): 829 – 837, 2004.

XU L., HAN T., WU J., ZHANG Q., ZHANG H., HUANG B., RAHMAN K., QIN L. *Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of Panax ginseng and its endophytic fungus*. PhytoMedicine, 16: 609–616, 2009.

YFF B. T. S., LINDSEY K. L., TAYLOR M. B., ERASMUS D. G., JAGER A. K. *The pharmacological screening of Pentanisia prunelloides and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid*. Journal of Ethnopharmacology, 79: 101–107, 2002.

YU H.; ZHANG L.; LI L.; ZHENG C.; GUO L.; LI W.; SUN P.; QIN L. *Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes*. Microbiological Research, 165, 437 – 449, 2010.

YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. 1: 18, 29, 41, 51, 53, 2001.

APÊNDICES

CÁLCULOS ANÁLITICOS PARA BIOQUÍMICA DOS FRUTOS (FIGUEREDO et al. 2008)

$$\text{Umidade por cento m/m} = \frac{100 \times N}{P}$$

onde N = perda de massa em gramas

P = gramas da amostra

Sólidos totais = 100 – umidade

Lipídeos = peso da fração final – peso do recipiente

Proteínas = Nitrogênio residual x 6,25

SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Solução salina

Cloreto de sódio (NaCl) 8,6 g

Água destilada 1000,0 mL

Modo de preparo: Misturar todos os ingredientes até dissolução do sal.

Autoclavar por 20 minutos a 1 atm. Conservar sob refrigeração a 4°C.

Meio Batata Dextrose Ágar

Batata descascada e cortada 200,0 g

Dextrose 20,0 g

Ágar 15,0 g

Água destilada p/1000,0 mL

Modo de preparo: Cozinhar as batatas em 250 mL de água destilada durante 20 minutos. Filtra-se, adiciona-se a dextrose e o ágar ao caldo e completa-se com água destilada para 1000 mL. Aquecer até dissolução do ágar. Autoclavar por 20 minutos a 1 atm. Conservar sob refrigeração a 4° C.

Meio Ágar Mueller Hinton

Infusão de carne bovina	30,0 g
Peptona de caseína ácida	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar	17,0 g
Água destilada	p/1000,0 mL

Modo de preparo: Misturar todos os ingredientes sob aquecimento até dissolução do ágar. Autoclavar por 20 minutos a 1 atm. Conservar sob refrigeração a 4° C.

Meio Sabouraud

Glicose	40 g
Peptona de caseína ácida	10 g
Ágar	15 g
Água destilada	p/1000,0 mL

Modo de preparo: Misturar todos os ingredientes sob aquecimento até dissolução do ágar. Autoclavar por 20 minutos a 1 atm. Conservar sob refrigeração a 4° C.

Meio Batata Dextrose Ágar modificado

Batata descascada e cortada	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	30,0 g
Água destilada	500,0 mL
Extrato hidroalcolico dos frutos	500,0 mL

Modo de preparo: Cozinhar as batatas em 250 mL de água destilada durante 20 minutos. Filtra-se, adiciona-se a dextrose e o ágar ao caldo e completa-se com água destilada para 500 mL. Aquecer até dissolução do ágar. Autoclavar por 20 minutos a 1 atm. Adicionar em proporção de 1:1 a 10 mL de extrato, previamente mantido sobre placas esterilizadas por 1 hora sob luz UV, para descontaminação. Homogeneizar a mistura em movimentos de “8”. Conservar sobre refrigeração a 4°C.

Meio Sabouraud modificado com extrato

Glicose	40 g
Peptona de caseína ácida	10 g
Ágar	30 g
Água destilada	500,0 mL
Extrato hidroalcolico dos frutos	500,0 mL

Modo de preparo: Misturar todos os ingredientes, exceto o extrato, sob aquecimento até dissolução do ágar. Autoclavar por 20 minutos a 1 atm. Adicionar em proporção de 1:1 a 10 mL de extrato, previamente mantido sobre placas esterilizadas por 1 hora sob luz UV, para descontaminação. Homogeneizar a mistura em movimentos de “8”. Conservar sobre refrigeração a 4° C.