

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**O POTENCIAL FARMACOLÓGICO E  
ANTIMICROBIANO DO FRUTO TUCUMÃ  
(*Astrocaryum aculeatum*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Micheli Lamberti Jobim**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**O POTENCIAL FARMACOLÓGICO E ANTIMICROBIANO DO  
FRUTO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*)**

**Micheli Lamberti Jobim**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGF), Área de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jobim, Micheli Lamberti

O potencial farmacológico e antimicrobiano do fruto tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) / Micheli Lamberti Jobim.- 2013.

67 p. ; 30cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) 2. Bactérias Gram-positivas 3. *Candida albicans* 4. Estresse oxidativo 5. Polifenóis I. Beatrice Mânica da Cruz, Ivana II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Dissertação de Mestrado

**O POTENCIAL FARMACOLÓGICO E ANTIMICROBIANO DO FRUTO  
TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*)**

elaborada por  
**Micheli Lamberti Jobim**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)**  
(Orientadora)

**Ionara Irion Dalcol, Dra. (UFSM)**

**Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 25 de Março de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus por ter iluminado meu caminho, e realizar mais um sonho.

Á amiga e orientadora Prof. Dr. Ivana, pela oportunidade, dedicação, paciência, orientação e aprendizado durante minha pesquisa. Sou eternamente grata pelo teu exemplo de pesquisadora e amiga.

Á minha mãe, por estar sempre ao meu lado, me dando apoio. Muito obrigada por tudo!

Ao meu namorado Jonas, por ter me incentivado à realização deste mestrado, por toda compreensão e estar sempre ao meu lado.

Ao co-orientador Prof. Dr. Roberto Christ, pelos esclarecimentos e disponibilidade a ajudar-me.

A professora e amiga Michele Sagrillo, pela amizade e apoio nesta minha etapa.

A aluna e estagiária do Laboratório de Microbiologia da UNIFRA Camilla Filippi, pela ajuda incansável na realização da parte experimental.

Ao Laboratório de Microbiologia e a UNIFRA pela disponibilidade de execução de grande parte experimental de minha pesquisa.

A toda equipe do Laboratório Biogenômica, pela ajuda na realização da parte experimental, e em especial aos meus colegas e amigos Clarice e Raul.

A Capes pela bolsa concedida.

Ao programa de Pós- graduação, pelo aprendizado juntamente com docentes qualificados.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **O POTENCIAL FARMACOLÓGICO E ANTIMICROBIANO DO FRUTO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*)**

Autor: Micheli Lamberti Jobim

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de Março de 2013.

Aguns compostos, como por exemplo, os polifenóis presentes em várias frutas, são capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. Estas propriedades estão presentes principalmente em frutos de áreas tropicais, como a região amazônica. Portanto, este estudo investigou a atividade antimicrobiana contra 37 microrganismos de um fruto amazônico conhecido como tucumã. O potencial papel de desequilíbrio do metabolismo oxidativo também foi estudado como mecanismo causal da atividade antimicrobiana. Os resultados mostraram efeito antibacteriano para os extratos hidroalcolólicos da polpa e da casca do tucumã em três bactérias gram- positivas (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) e efeito antifúngico contra *Candida albicans*. A contribuição antimicrobiana dos principais compostos químicos (quercetina, rutina,  $\beta$ - caroteno, ácidos clorogênicos, cafeico e gálico) encontrados em extratos do tucumã também foi investigada, apresentando um efeito inibidor dependendo principalmente do microrganismo, em bactérias pela quercetina e no fungo pela rutina. Análise da cinética da liberação de DNA no meio extracelular por fluorescência utilizando o ensaio de DNA Pico Green<sup>®</sup> e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mostrou efeito inibitorio do tucumã no potencial desequilíbrio oxidativo. Em *B. cereus* e *C. albicans* este efeito foi claro após as 24 horas onde os níveis de ROS foram maiores quando comparados ao grupo controle negativo. Em conclusão, os extratos de tucumã apresentam atividade inibitória de quatro microrganismos que possuem grandes problemas de resistência aos fármacos, e o possível mecanismo de ação deste fruto amazônico está relacionada com o desequilíbrio REDOX.

Palavras chave: *Astrocaryum aculeatum*; gram- positivas; *Candida albicans*; estresse oxidativo; polifenóis.

## ABSTRACT

Master of Sciences  
Programa de Pós Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **THE POTENTIAL PHARMACOLOGICAL AND ANTIMICROBIAL FRUIT TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*)**

Author: Micheli Lamberti Jobim

Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, March 25, 2013.

Several compound present in fruits as polyphenols are able to kill or inhibit the growth of microorganisms. These proprieties are relevant mainly in tropical areas, as Amazonian region where infectious are highly prevalent. Therefore, this study investigated the tucumã Amazonian fruit antimicrobial activity against 37 microorganisms. The potential role of oxidative metabolism imbalance was also studied as causal mechanism of antimicrobial activity. The results showed antibacterial effect of pulp and peel tucumã hydro-alcoholic extracts on three gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) and antifungal effect against *Candida albicans*. The antimicrobial contribution of main chemical compounds (quercetin, rutin,  $\beta$ -carotene and gallic, caffeic and chlorogenic acids) found in tucumã extracts was also investigated showing an inhibitory effect depending of the organism mainly by quercetin in bacteria and rutin in *C.albicans*. Analysis of kinetic of DNA releasing in extracellular medium by fluorescence using DNA Pico Green assay® and reactive oxygen species production (ROS) showed potential oxidative imbalance contribution on tucumã inhibitory effect. In *B.cereus* and *C.albicans* this effect was clear since after 24 hours the ROS levels were higher when compared to negative control group. In conclusion, tucumã extracts present antimicrobial activity to four microorganisms that have large problems of drug resistance, and the possible mechanism of action of this Amazon fruit is related to REDOX imbalance.

Key- words: *Astrocaryum aculeatum*; Gram-positive; *Candida albicans*; oxidative stress; polyphenols.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Resistência antimicrobiana .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Biofilme .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Produtos de origem vegetal e seu potencial antimicrobiano .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Produtos de origem vegetal no Brasil e seu potencial antimicrobiano .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Tucumã .....</b>	<b>15</b>
<b>1.6 O estresse oxidativo como mecanismo causal da ação antimicrobiana de extratos vegetais .....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3 ARTIGO.....</b>	<b>22</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Resistência aos antimicrobianos

A evolução da resistência aos antimicrobianos tem se tornado uma ameaça a saúde pública devido o uso inadequado dos medicamentos anti-infecciosos juntamente com medidas também inadequadas de controle da disseminação de infecções (OMS, 2012). Para haver resistência é necessário que alguns microrganismos de uma dada espécie possuam variação genética que impeça a sua morte ou a inibição do seu crescimento. A variação genética pode acontecer de duas formas: a inata (intrínseca) que ocorre por acúmulo de mutações e a adquirida que ocorre através do processo de recombinação genética, por exemplo, conjugação (TRAVASSOS; MIRANDA, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), resistência antimicrobiana é a resistência de um microrganismo a um medicamento antimicrobiano a que foi anteriormente sensível. Organismos resistentes são capazes de sobreviver a medicamentos antimicrobianos, de modo que os tratamentos convencionais tornam-se ineficazes e as infecções tornam-se persistentes. A resistência antimicrobiana se desenvolve quando um microrganismo possui alguns indivíduos com mutações que, potencialmente protegem o organismo de morrer na presença de um dado fármaco. Assim, se este microrganismo é exposto a este medicamento a maior parte composta por indivíduos suscetíveis, irá morrer. Em consequência os sobreviventes tendem a se proliferar. Esta condição cria então o que se chama, por exemplo, de resistência bacteriana.

No ano de 2011 a resistência antimicrobiana foi o tema do Dia Mundial de Saúde, pois a mesma pode ser causada pelo uso indevido dos produtos farmacêuticos. Sem uma ação urgente e atenção do público, a resistência antimicrobiana ameaça o mundo a voltar à era pré-antimicrobiana, quando não havia tratamento eficaz para malária, tuberculose, pneumonia e meningite. Atualmente o uso de antimicrobianos tem produzidos avanços na saúde pública, entre eles declínio na morbidade por malária, tuberculose e sífilis congênita. Porém, todo esse progresso está seriamente ameaçado com o aumento do número de microrganismos

resistentes levando a um aumento da mortalidade, altos custos de tratamento, maior propagação e duração da doença (PERIAGO, 2011).

A resistência a agentes físicos e químicos pelos microrganismos é um fenômeno conhecido há bastante tempo. Sabe-se que em 1929, ano da descoberta da penicilina por Fleming, já se observava cepas de bactérias resistentes a este antibiótico. Com o surgimento da penicilina e sulfonamidas acompanhado da constante ascensão dos mesmos, novas classes de antibióticos foram produzidos em grande escala, principalmente nos países desenvolvidos. No entanto, nos dias atuais esta produção diminuiu de forma considerável, visto que a velocidade com que têm surgido bactérias multirresistentes é superior à velocidade com que os antibióticos estão sendo desenvolvidos (TRAVASSOS; MIRANDA, 2010).

Assim, as bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento das infecções. Na década de 80, a introdução de fluoroquinolonas significou um avanço na terapêutica das infecções a bactérias multirresistentes, principalmente as do trato urinário. Porém trabalhos mais recentes têm alertado para um aumento na frequência de bactérias resistentes as quinolonas, principalmente em pacientes com septicemias graves causadas por bactérias provenientes do trato urinário (LOPES et al., 1998).

A disponibilidade de antimicrobianos no mercado brasileiro que perdurou durante muitos anos, acompanhada de publicidade ou fontes duvidosas, sempre incentivaram o uso abusivo e indiscriminado de antibióticos, em consequência, contribuiu para a promoção de quadros de resistência, principalmente pela automedicação (TRAVASSOS; MIRANDA, 2010).

Esta questão é bastante complexa e grave, pois segundo estudos prévios, o ciclo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco leva cerca de 12 a 15 anos dependendo da natureza deste. Cada desenvolvimento pode, em média, custar U\$ 900 milhões dependendo da complexidade do produto em desenvolvimento, e apenas um novo fármaco entre três desenvolvidos será capaz de cobrir esse custo. Este contexto diminui a disponibilidade de novos antimicrobianos no mercado (YANG et al., 2011).

## 1.2 Biofilme

A primeira publicação detalhada que descreve biofilmes foi descrita por Zobell em 1943, onde o autor iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios principalmente e em diferentes tipos de superfícies que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas (FILHO et al., 2010).

Técnicas de microscopia mais sofisticadas verificaram que, a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais, se encontra em comunidades que estão fixas a uma superfície. Ou seja, estes organismos não estão dispersos em suspensão. A estes microrganismos aderidos foi atribuído o nome de biofilme (FILHO et al., 2010). Assim, outro aspecto relevante ao problema de resistência de antimicrobianos convencionais trata-se dos biofilmes.

Os biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície, onde células pertencentes ao biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas, levando a um aumento da resistência antimicrobiana. Biofilmes microbianos são produzidos por culturas puras de bactérias e por consórcios de microrganismos, que podem incluir fungos, protozoários e algas (MAH; O'TOOLE, 2001; RAMAGE et al., 2011; FILHO et al., 2010). Segundo Machado (2005), estima-se que mais de 90% dos microrganismos vivem sob a forma de biofilmes e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias.

Devido à natureza heterogênea do biofilme, estrutura física e/ou química dos exopolissacarídeos ou outros aspectos da arquitetura do biofilme induzem a uma resistência antifúngica complexa e multifacetada, podendo ser induzível em resposta a determinado composto ou uma alteração genética irreversível resultando na exposição prolongada (MAH; O'TOOLE, 2001; RAMAGE et al., 2011).

Os biofilmes apresentam um fenótipo particular na resistência das bactérias, devido às bactérias ficarem aderidas no invólucro na matriz extracelular composto de biomoléculas. Mais de 80% de todas as infecções bacterianas estão diretamente relacionadas ao resultado do biofilme, compreendendo patógenos clinicamente relevantes (ROGERS et al., 2010).

Por exemplo, infecções causadas por *Candida sp.* estão frequentemente associadas com a formação de biofilme. Muitos dispositivos intravasculares utilizados em hospitais, como por exemplo, cateteres podem tornar-se colonizados

por *Candida sp.* permitindo estruturas aderentes que formam o biofilme, do qual as células podem se separar e causar uma fungemia aguda e/ou infecção disseminada. Recentes estudos mostram que as células provindas do biofilme tem uma maior associação de mortalidade do que leveduras equivalentes. Estas infecções causadas a partir de implantes de biofilmes são difíceis de resolver e podem exigir tanto terapias antifúngicas em longo prazo e/ou eliminação física desses implantes (RAMAGE et al., 2011).

Deste modo, o contexto atual demanda pesquisas continuadas que auxiliem na identificação de novos compostos ou conjuntos de compostos que tenham atividade antimicrobiana principalmente para aqueles microrganismos que já apresentam um quadro claro de resistência.

### **1.3 Produtos de origem vegetal e seu potencial antimicrobiano**

Historicamente plantas tem fornecido uma boa fonte de agentes antibacterianos e a busca de plantas com atividade antimicrobiana ganhou importância nos últimos anos. Os medicamentos fitoterápicos têm sido amplamente usados formando uma parte integrante de cuidados primários de saúde em muitos países, ou seja, podem constituir um reservatório de novas substâncias antimicrobianas a serem descobertas (ASSOB et al., 2011).

Assim as plantas têm sido desde a antiguidade um recurso ao alcance do ser humano, o homem aprofundou seus conhecimentos para a melhoria nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades. O ser humano percebeu que algumas substâncias presentes nas plantas administradas sob a forma de mistura ou transformada tem a propriedade de provocar reações benéficas ao organismo, capazes de resultar na recuperação da saúde (CRUZ-SILVA; PELINSON; CAMPELO, 2009).

A humanidade aprendeu a utilizar as propriedades das substâncias químicas exógenas em rituais festivos, na cura de doenças e mesmo como veneno, sendo a maioria destas substâncias preparadas a partir de plantas. Galeno, o fundador da Farmácia, divulgou o uso de extratos vegetais para a cura de diversos males, denominadas fórmulas galênicas. Por volta do século XV suas teorias foram divulgadas e surgiram os primeiros embriões das farmacopeias, reunindo o

conhecimento acumulado sobre o uso de remédios de origem vegetal (BARREIRO, 2001).

Talvez uma das plantas mais antigas empregadas pelo homem seja a *Papaver somniferum*, que originou o ópio. O ópio era conhecido das civilizações antigas, havendo relatos que confirmam seu uso desde 400 a.c. sendo vulgarizado no século XVI como analgésico (BARREIRO, 2001).

Em alguns países como a Nigéria, por exemplo, os extratos de espécies com propriedades conservantes naturais são mais utilizados do que os antimicrobianos sintéticos. Os sistemas antimicrobianos naturais presentes nas plantas, animais ou microrganismos estão cada vez mais ganhando adeptos no âmbito da conservação natural, especialmente em atividades antimicrobianas a partir de extratos de vários tipos de plantas e partes de plantas que são usadas como agentes saborizantes em alguns alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Para resolver o problema de resistência aos antimicrobianos, várias alternativas têm sido sugeridas, tais como a busca de novos antimicrobianos em espécies de plantas encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (OSTROSKY et al., 2008). Na Europa, cada vez mais está crescendo o uso dos antimicrobianos naturais, especialmente em combinação com outras técnicas modernas de controle, como análise de riscos e o controle de pontos críticos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

#### **1.4 Produtos de origem vegetal no Brasil e seu potencial antimicrobiano**

O Brasil é considerado um País megadiverso, possuindo aproximadamente cerca de 80.000 espécies de plantas que potencialmente oferecem uma variedade de matérias-primas para a descoberta de novos medicamentos. A OMS estima que 65- 80% das pessoas nos países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional e 85% destes utilizam extratos de plantas. A OMS incentiva e recomenda a investigação sobre a utilização da flora local para fins terapêuticos com intenção de diminuir o número de pessoas excluídas dos sistemas de saúde do governo, o que poderia construir um tratamento alternativo economicamente viável de diversas doenças (POLITI et al., 2011).

A utilização dessas plantas tornou-se uma prática generalizada na medicina popular, utilizada não somente nas zonas rurais como também no meio urbano de forma alternativa ou complementar aos tratamentos da medicina oficial. No Brasil, as plantas ocupam posição de destaque em relação ao uso à importância do uso popular medicinal. Estudos a cerca deste assunto, possibilitam o resgate e a preservação dos conhecimentos populares das comunidades envolvidas (CRUZ-SILVA; PELINSON; CAMPELO, 2009).

A população tem procurado cada vez mais adotar hábitos mais saudáveis de vida, em busca de longevidade. Para que esses hábitos se modifiquem é necessária a mudança de hábitos alimentares. Embora atualmente, seja dada uma atenção especial a alimentos funcionais, esse assunto é tão antigo quando a Medicina, há aproximadamente 2500 anos, Hipócrates, o pai da medicina, já dizia “Faça do alimento seu medicamento, e não do medicamento seu alimento” (FELIPIN; FRIZZO, 2010).

Os fármacos de origem sintética nem sempre são efetivos, pois os fármacos disponíveis no mercado produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade (FENNER et al.; 2006).

A escassez de doença infecciosa em plantas selvagens torna-se por si só uma indicação do mecanismo de defesa bem sucedida desenvolvida por elas. Os mecanismos de defesa das plantas podem ser devido à produção de uma enorme variedade de pequenas moléculas conhecidas como fitoalexinas, que são acumulados nas plantas após a exposição de microrganismos ou agentes abióticos. Estas fitoalexinas contêm estruturas como flavonóides, terpenóides, glicocorticóides e polifenóis, sendo compostos biologicamente ativos que apresentam propriedades antimicrobianas (PANGHAL; KAUSHAL; YADAV, 2011).

A baixa incidência de doenças em algumas populações chamou atenção dos cientistas para a prevenção, ou até mesmo a cura de algumas doenças, baseada na sua dieta. Os esquimós com a alimentação baseada em peixes e produtos do mar ricos em ômega 3 e 6, tem baixo índice de problemas cardíacos, assim como os franceses consumidores de vinho tinto (ANJO, 2004).

Em regiões tropicais, existe um número extenso de doenças infecto-parasitárias, incluindo as microbianas que são principalmente transmitidas por vetores artrópodos. Em contrapartida, também existe um grande número de plantas que tem potencial antimicrobiano. Entretanto, grande parte destas plantas ainda é

pouco estudada (POLITI et al., 2011). Muitas destas plantas são consumidas sob a forma de alimentos, como é o caso do guaraná (BASILE et al., 2005).

Um estudo epidemiológico realizado por Krewer e colaboradores (2011) em idosos ribeirinhos que vivem no município de Maués no Estado do Amazonas também sugeriu que a ingestão habitual de guaraná em pó estaria associada com menor prevalência de doenças transmissíveis e não transmissíveis, como a hipertensão, obesidade e síndrome metabólica.

Deste modo uma questão em aberto é se outras plantas consumidas como alimentos também possuiriam atividade microbiana relevante, principalmente para espécies que contemporaneamente apresentam resistência aos fármacos disponíveis.

## **1.5 Tucumã**

A região amazônica oferece um grande número de espécies oleaginosas que apresentam potencialidade econômica e perspectiva de valorização para a região desde que processadas racionalmente (FREITAS et al., 2006). Este é o caso do fruto do tucumã que é popularmente consumido no Amazonas pela população em geral.

O tucumã é uma espécie pertencente à família da Arecaceae (Palmeiras), conhecida popularmente pelo nome de tucumanzeiro. Essa palmeira ocorre principalmente nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima, mas também em algumas partes do Pará, Peru e Colômbia (SHANLEY; MEDINA, 2005).

O tucumã do Amazonas, assim também conhecido, é uma palmeira grande, pode atingir 25 metros de altura, seus frutos grandes são bastante nutritivos apreciados por pessoas e animais. Próximo a Manaus é comum florescer de julho a janeiro e frutificar de fevereiro a agosto, porém em Manaus a frutificação ocorre durante todos os meses do ano (SHANLEY; MEDINA, 2005). (Figura 1).



Figura 1: População de Tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum aculeatum*). Adaptado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) ([www.inpa.gov.br](http://www.inpa.gov.br))

Os frutos possuem um peso que varia entre 20 e 100 gramas, a produtividade média das palmeiras é de 12 quilos de frutos por ano (SHANLEY; MEDINA, 2005). Além disso, servem para a alimentação humana e animais domésticos, dos quais o mesocarpo (polpa) é considerado uma fonte alimentícia altamente calórica, devido ao elevado conteúdo de lipídios, apresenta ainda quantidade expressiva do precursor da vitamina A, teores satisfatórios de fibra e vitamina E. O óleo considerado comestível, de cor amarela extraído do mesocarpo possui características organolépticas e nutritivas de alto valor para a indústria de alimentos e cosmética (YUYAMA et al., 2005). (Figura 2).

Toda planta do tucumã pode ser aproveitada, pode-se salientar o uso do fruto na alimentação, como por exemplo, o sanduiche de tucumã, o “famoso” xis caboquinho, o caroço para alimentar animais domésticos e na defumação de borrachas, a palha para tecer leques e esteiras e por fim o tronco por ser bastante resistente é utilizado para construções rurais (SHANLEY; MEDINA, 2005).





Figura 2: Tucumãs (inteiros, parcialmente descascados, e seccionados). Adaptado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) ([www.inpa.gov.br](http://www.inpa.gov.br))

A partir de um estudo realizado com cromatografia líquida de alta- detecção de fotiodo e espectrometria de massa (HPLC- PDA- MS/ MS) foi detectado no fruto de tucumã a presença de carotenóides, sendo considerada boa fonte de provitamina A (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007). No tucumã o trans- $\beta$ -caroteno foi o carotenóide encontrado em maior concentração representando 75% de todos os carotenóides identificados e quantificados.

Após a identificação da concentração de carotenóides avaliada, a quantidade estimada de pró-vitamina A no tucumã foi de 850 RE/100g (equivalentes de retinol). Considerando a presença de pró-vitamina A em outras frutas como a manga (104 a 127 RE/100g), papaia (19 a 74 RE/100g), acerola (148 a 283 RE/100g), brócolis (131 a 194 RE/100g), verduras folhosas (429 a 640 RE/100g), cenoura crua (308 a 625 RE/100g) e acerola (67 a 87 RE/100g) o tucumã apresenta níveis mais altos deste composto (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007).

Segundo estudos de Garcia e colaboradores (2012), os extratos etanólicos de casca e polpa, apresentam compostos bioativos como fenóis totais, taninos, flavonóides, alcaloides e carotenóides. O conjunto destes compostos provavelmente contribuem para atividade antioxidante mais elevada, porém concentrações elevadas do extrato de tucumã podem levar a uma citotoxicidade.

Por exemplo, a vitamina A do qual o tucumã possui diversas retinóides incluindo o ácido all-trans retinóico (ATRA) influencia o crescimento e diferenciação de células neoplásicas e saudáveis, tendo assim reconhecida atividade

anticarcinogênica e antitumoral. Por este motivo, o ATRA é um dos principais fármacos utilizados no tratamento das leucemias, principalmente a leucemia promielocítica (LOTAN et al., 1980; SMITH et al., 1992).

Estudos identificaram que a proteína que aumenta a permeabilidade bactericida (*bactericidal/permeability increasing protein, BPI*) tem a capacidade de neutralizar os efeitos pró-inflamatórios associados aos lipopolisacarídeos bacterianos e assim tem potencial uso clínico no tratamento contra infecções gram-negativas. Um estudo *in vitro* utilizando a linhagem comercial de células pró-mielocíticas NB4 geralmente não expressam a proteína BPI. Entretanto, quando estas células são tratadas com ATRA, este tipo de ácido retinóico induz a expressão destas proteínas (LENNARTSON et al., 2006).

Outros estudos como o descrito por Maeda e colaboradores (2007) descreveram que o ATRA ataca diretamente a enzima transcriptase reversa resultando na inibição da replicação do vírus HIV-1.

O tucumã também é rico em flavonóides como a quercetina. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana verificada a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, ainda que existam dados conflitantes na literatura. Entretanto, estudos mostram que a quercetina, por exemplo, tem ação antibacteriana por ter a capacidade de inibir a enzima DNA girase que é fundamental para que ocorra a replicação do DNA e assim a proliferação celular (CUSHNIE; LAMB, 2005). Apesar do seu alto potencial antioxidante estudos relacionados ao efeito de extratos hidroalcoólicos do tucumã em diversos aspectos do perfil antimicrobiano são bastante incipientes. Deste modo, investigações sobre o seu potencial papel antimicrobiano para o desenvolvimento de novos fármacos naturais ou até mesmo possíveis suplementos nutracêuticos tornam-se relevantes.

## **1.6 O estresse oxidativo como mecanismo causal da ação antimicrobiana de extratos vegetais**

Existem múltiplas rotas biológicas relacionadas com a ação antimicrobiana desencadeada por compostos naturais e sintéticos. Entre estas se encontra a modulação diferencial do metabolismo oxidativo dos microrganismos.

Como é sabido a capacidade de manter as concentrações intracelulares de espécies ativas de oxigênio (EAOs) que em níveis elevados são tóxicas é essencial

para todos os organismos que possuem metabolismo aeróbico. Isto porque, ocorre produção continuada de EAOs em tais organismos e para evitar danos o mesmo conta com sistemas antioxidantes endógenos e exógenos.

Uma vez que aproximadamente 5% do oxigênio que chega no interior das células não é utilizado na produção de ATP e torna-se desemparelhado formando uma EAO conhecida como “anion superóxido” ( $O_2^{\bullet-}$ ) a enzima superóxido dismutase atua sobre este ânion dismutando o  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e oxigênio molecular. Por outro lado, as enzimas catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx) atuam sobre o  $H_2O_2$  convertendo esta molécula em  $H_2O$  e assim inativando o potencial dano causado tanto pelo  $O_2^{\bullet-}$  quanto pela  $H_2O_2$  (TOYOKUNI et al., 1995).

O  $H_2O_2$  que é continuamente formado nas células aeróbias e também pode ser gerado por processos químicos alternativos é altamente tóxico para agentes microbianos, em especial as bactérias (independente de serem aeróbias ou anaeróbias). Deste modo estes microrganismos produzem enzimas antioxidantes para impedir os efeitos letais do  $H_2O_2$ . Estudos mostram que bactérias mutantes que não produzem estas enzimas possuem altas taxa de mutagênese, crescem muito pouco e geralmente morrem (MISHRA; IMLAY, 2012).

Quando se trata de microrganismos como as bactérias, estas podem ser expostas a grandes quantidades de EAOs uma vez que tais moléculas são utilizadas pelo sistema imune inato como primeira linha de defesa contra estes microorganismos. Segundo a revisão feita por Dubbs e Mongkolsuk (2012) estudos têm mostrado que bactérias evoluíram sensores de níveis de EAOs que auxiliam as mesmas a responder de modo mais apropriado ao estresse oxidativo. Os três compostos mais bem estudados são os reguladores de peróxido OxyR, PerR que auxiliam as bactérias a detectar os níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o OhrR que auxilia na detecção de peróxidos orgânicos (ROOH) e hipoclorito de sódio (NaOCl). Na presença de EAOs estas moléculas mudam a sua conformação química e subsequentemente induzem a expressão de genes que irão auxiliar as bactérias a se protegerem. Estes reguladores da transcrição também influenciam fenômenos biológicos complexos como a formação do biofilme, a fuga dos patógenos a resposta imune, a resistência a antibióticos via regulação direta de proteínas específicas.

Deste modo, compostos que desregulem estas rotas metabólicas podem auxiliar no aumento do estresse oxidativo microbiano induzindo os mesmos a morte.

Uma vez que frutos, como o tucumã possuem níveis elevados de compostos bioativos, principalmente antioxidantes estudos sobre a sua potencial atividade antimicrobiana via modulação diferencial do metabolismo oxidativo são relevantes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Analisar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico da polpa e da casca do fruto *Astrocaryum aculeatum* e a potencial modulação do metabolismo oxidativo como mecanismo causal.

### 2.2 Específicos

Determinar a ação dos extratos em trinta e sete estirpes microbianas (incluindo cepas bacterianas e fúngicas);

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente aos microrganismos previamente “suscetíveis” e analisar o desempenho dos extratos contra os diferentes microrganismos através de ensaios de cinética;

Verificar a ação antimicrobiana dos principais compostos (isolados/ combinados) presentes nos extratos de *Astrocaryum aculeatum* (quercetina, rutina, ácido gálico, ácido clorogênio, ácido caféico e beta-caroteno);

Verificar a ação antibiofilme dos extratos para os microrganismos suscetíveis;

Caracterizar o mecanismo pró- oxidante de ação dos extratos de *Astrocaryum aculeatum* através da análise da produção de radicais livres e genotoxicidade.

### 3 ARTIGO

Os itens “Materiais e métodos” e “Resultados” referentes a esta dissertação, estão apresentados sob a forma de um manuscrito a seguir. A apresentação do manuscrito está baseada na versão submetida à revista *Microbiological Research* (Índice de impacto: 2,308, Qualis B1 na área Microbiologia e Genética da Capes), com o título de “Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism”.

#### **ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AMAZON *Astrocaryum aculeatum* extracts AND ITS ASSOCIATION TO OXIDATIVE METABOLISM**

Micheli Lamberti Jobim<sup>a</sup>, Roberto Christ Vianna<sup>bf\*</sup>, Camilla Filippi dos Santos Alves<sup>f</sup>, Raul Moreira Oliveira<sup>c</sup>, Clarice Pinheiro Mostardeiro<sup>a</sup>, Michele Rorato Sagrillo<sup>a</sup>, Olmiro Cezimbra de Souza Filho<sup>a</sup>, Luiz Filipe Machado Garcia<sup>a</sup>, Maria Fernanda Manica-Cattani<sup>cd</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>e</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano

<sup>c</sup> Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

<sup>e</sup> Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Brazil

<sup>f</sup> Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Ciências da Saúde, Centro Universitário Franciscano

\* Corresponding author: Prof. Roberto Christ Vianna Santos, PhD.

E-mail: [robertochrist@gmail.com](mailto:robertochrist@gmail.com); [roberto@unifra.br](mailto:roberto@unifra.br)

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Ciências da Saúde, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA. Phone/Fax: + 55 (55) 3220-1200

Rua dos Andradas 1614, sala 413A. Zip Code 97010-032, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

## Abstract

Several compounds present in fruits as polyphenols are able to kill or inhibit the growth of microorganisms. These properties are relevant mainly in tropical areas, as Amazonian region where infectious are highly prevalent. Therefore, this study investigated the antimicrobial activity of tucumã Amazonian fruit against 37 microorganisms. The potential role of oxidative metabolism imbalance was also studied as causal mechanism of antimicrobial activity. The results showed antibacterial effect of pulp and peel tucumã hydro-alcoholic extracts on three Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) and antifungal effect against *Candida albicans*. The antimicrobial contribution of main chemical compounds (quercetin, rutin,  $\beta$ -carotene and gallic, caffeic and chlorogenic acids) found in tucumã extracts was also investigated showing an inhibitory effect depending of the organism mainly by quercetin in bacteria and rutin in *C.albicans*. Analysis of kinetic of DNA releasing in extracellular medium by fluorescence using DNA Pico Green assay<sup>®</sup> and reactive oxygen species production (ROS) showed potential oxidative imbalance contribution on tucumã inhibitory effect. In *B.cereus* and *C.albicans* this effect was clear since after 24 hours the ROS levels were higher when compared to negative control group. In conclusion, tucumã extracts present antimicrobial activity to four microorganisms that have large problems of drug resistance, and the possible mechanism of action of this Amazon fruit is related to REDOX imbalance.

## Key-words

*Astrocaryum aculeatum*; Gram-positive; *Candida albicans*; oxidative stress; polyphenols.

## Introduction

Amazonian ethnobotanical inventories widely support the perception, with tribal pharmacopoeias often representing dozens, if not hundreds, of botanical species has reputed medicinal value (Balée et al., 1994; Herndon et al., 2009). Besides the use of herbal plants by Amazonian peoples, there are a large number of fruits rich in bioactive compounds that also have pharmacological potential. This presupposition is based in a large body of evidences showing that a large part of fruits and grains properties are not only due to the well-known vitamins and minerals, but due a variety of other non-nutritive biologically active compounds that presents specific actions on human health (Walter, 2008).

Unfortunately, a large number of fruits consumed in the Amazonian region are few studied including their potential antimicrobial activity. Therefore, investigations focusing these fruits are relevant since microbial infectious diseases continue to be one of the leading causes of morbidity and mortality; nowadays there is a widespread antibiotic resistance and the world live the emergence of new pathogens as well as some old pathogens are resurgence (WHO, 2002). Several compound present in fruits as polyphenols and anthocyanins are able to kill or inhibit the growth of microorganisms such as bacteria, fungi, or protozoans (Landete, 2012; Cisowska et al., 2011).

Considering the potential antimicrobial activity of fruits rich in these compounds we investigated here the tucumã Amazonian fruit (*Astrocaryum aculeatum*) that is native in tropical South America and has a range extending



northwards towards Central America, Trinidad and the West Indies (Shanley, Cymerys, & Medina, 2011). This palm fruit is a popular traditional component of regional breakfasts (Shanley et al., 2011).

Cell redox homeostasis is very important to microbial survival and situations that increase the Reactive Oxygen Species (ROS) levels mainly hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and antioxidant levels can affect the microbial growing and viability (Mishra and Imlay, 2012; Landete, 2012). Therefore, tucumã could to present the ability to kill or inhibit the growth of microorganisms due their chemical antioxidant compounds present in its composition (Landete, 2012). This hypothesis was tested here from an *in vitro* antibacterial and antifungal assays using peel and pulp tucumã extracts with polyphenols and other bioactive compounds chemically quantified. The main chemical compounds (separately and in combination) found in tucumã extracts were also tested to verify its contribution in the antimicrobial activity. Since the tucumã extracts are rich in antioxidant compounds was postulated that antimicrobial effect could to be explain by REDOX imbalance in the culture medium that interfere on cellular growth and viability. Therefore, we performed two additional analyses in the susceptible microorganisms to evaluate if the tucumã extracts presented acute cytotoxic effect evaluating the releasing of extracellular DNA and the influence of the extracts in ROS concentration in culture medium.

## **Material and Methods**

### *Collection, identification and processing of plant material*

The fresh matured fruits of *Astrocaryum aculeatum* were obtained from a native forest near Manaus City (Amazonas State, Brazil), located in the Amazonian region (3.08°S, 60.01°W). A voucher of tucumã extracts were deposited in the Herbarium of Universidade Federal de Santa Maria, Brasil. The pulp and peel tucumã extracts were obtained as described in Garcia et al (2013). Briefly, the pulp and peel were manually removed, producing 800 g peel and 400 g pulp, and kept frozen at -18°C until extraction procedures were performed one week later.

#### *Extracts characterization*

The ethanolic tucumã extracts were prepared from tucumã pulp and peel samples that were triturated separately and placed into sealed amber glass containers with an absolute ethanol solution at a ratio of 1:5 (w / v). The extraction was performed over four days. The homogenate was filtered through Whatman No. 1 paper and collected; the ethanol was removed using a rotary evaporator under reduced pressure at 25°C and 115 rpm. The pulp and peel extracts were then lyophilized and stored at -20°C until they were examined. We obtained 3,359 g of tucumã peel extract and 6,091 g of tucumã pulp extract.

The chemical composition of pulp and peel tucumã extracts used in the present study was previously determined by Garcia et al (2013) using spectrophotometric and chromatographic analyses (HPLC-DAD-MS). Chemical content of tucumã extracts are present in Table 1.

**Table 1** Chemical compounds presented in pulp and peel tucumã extracts (*A.aculeatum*).

Compounds	Peel extract Total value	Pulp extract Total value
TPC (mg/GAE g)	941.8	872.1
Flavonoids (quercetin mg/g)	92.8	53.3
Tannin (mg/g)	31.4	8.24
Alkaloids (mg/g)	1.5	0.93
β-carotene (mg/g)	62.91	27.55
Rutin (mg/g)	30.54	19.06
Quercetin (mg/g)	12.72	6.53
Gallic acid (mg/g)	3.79	14.25
Caffeic acid (mg/g)	8.33	0.87
Chlorogenic acid (mg/g)	3.04	1.19

GAE= gallic acid equivalent; TPC= total phenolic content expressed as extract; the total value were determined from three replicate measure performed to each compound analysis.

### *Microorganisms*

The Microbial strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC): *Paenibacillus larvae* (ATCC 9545), *Bacillus cereus* (ATCC 9634), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 1008), *Candida albicans* (ATCC 90028). Clinical and environmental isolates kindly provided by the Department of Microbiology, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) were also used to test

antimicrobial activity of tucumã extracts: *Paenibacillus thiaminolyticus*, *P. pabuli*, *P. azotofixans*, *P. alginolyticus*, *P. validus*, *Saccharomyces* sp., *Pseudomonas luteola*, *P. fluorescens*, *Serratia* sp *Staphylococcus saprophyticus*, *Shigella sonnei*, *Morganella morganii*, *Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Escherichia coli* (ampicillin resistant), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia liquefaciens*, *Proteus* sp., *Streptococcus pyogenes*, *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans*, *C. grubii*, *Rhodotorula* sp.. All isolates were maintained on nutrient agar slants at 4°C.

#### *Preparation of inoculums*

The inoculum size of the test isolates was standardized according to the Clinical Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2009). Briefly the microbial suspension were prepared by making a saline suspension of isolated colonies selected from brain heart infusion agar, and the agar plates were grown for 18 to 24 h. The suspension was adjusted to match the tube of 0.5 McFarland turbidity standard using the spectrophotometer of 600 nm, which equals to  $1.5 \times 10^8$  colony-forming units (CFU)/ml.

#### *Antimicrobial assays*

##### *Determination of inhibition zone diameter (IZD)*

The *in vitro* activity of the samples was evaluated by utilizing the disk diffusion method using Müller–Hinton Agar (MHA, Hi-media, Mumbai, India) with determination of inhibition zones diameter in millimeter (mm) (CLSI, 2009). Briefly,

the sterile paper discs (6 mm) impregnated with 15 µl of peel and pulp extracts were suspended in sterile distilled water. The surface of MHA was completely inoculated using a sterile swab, which steeped in the prepared suspension of bacterium. Finally, the impregnated disks were placed on the inoculated agar and incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the diameter of the growth inhibition zones was measured. Cefepime(30 µg) and Isoconazole (1mg/µg/ml) were used as experimental positive controls and 5% DMSO as negative control. All tests were done in triplicate.

An additional IZD test was realized to evaluate the antimicrobial contribution of the main antioxidant chemical compounds found in tucumã extracts to microorganisms that presented inhibition zones. The chemical compounds analyzed separately and in combination test were: β-carotene, rutin, quercetin, gallic, caffeic and chlorogenic acid (Table 1). All compounds were diluted in phosphate buffered saline (PBS) 1X in similar concentrations found in peel and pulp extracts used in the present study.

#### *Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)*

The extracts which showed the ability to inhibit the growth of microorganisms were tested for minimum inhibitory concentration (MIC) by the microdilution technique. The MIC of extracts were determined in Mueller–Hinton broth (Difco). The assay was carried out in 96-well microtitre plates. Each extract was mixed with an inoculum prepared in the same medium at a density adjusted per tube to 0.5 of the McFarland scale ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) and the active extracts/fractions were diluted two-fold serially ranging from 0.048 to 6.25 mg/ml. Microtitre trays were incubated at 37 °C and the MICs were recorded after 24 h of incubation. The MIC was defined as

the lowest concentration of extract that inhibits bacterial growth. This test was performed in triplicate on separate occasions. The 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride was used as an indicator of bacterial growth.

#### *Kill-kinetics study*

The rate and extent of bacterial killing by tucumã extracts was studied by kill-kinetics assay method. Growing cultures ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) of susceptible microorganisms were added to Casoy Broth (Hi-media) and were exposed to 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 x the MIC of pulp and peel tucumã extracts. Drug free inoculated medium was also plated as a growth control. Samples were removed for colony counts at 0 to 10h with 1h intervals. Viable counts were determined by the serial dilution method. Plates were incubated at 37°C for 24 h. Plate counts were made after 24 h of incubation and only plates containing between 30 and 300 counts for each series of dilution were counted. The procedure was repeated in triplicate for each test organism and the means of the readings were computed and recorded. Antimicrobial experimental positive controls used in this protocol were specific by the microorganisms that presented susceptibility to tucumã extracts.

#### *Effect of tucumã extracts on biofilm formation*

Biofilm study was performed by the method published by Merritt et al. (2005) with modifications. Briefly, *C. albicans* was inoculated in 2-5 ml of Trypticase soy broth (TSB) and grew up to stationary phase and the turbidity was adjusted at 0.5 MacFarland scale. 100 µl of each dilution was pipeted to 96 wells in a sterile flat bottom microtiter plate. After incubation at 37C° for 24h, planktonic bacteria were

removed from all of the wells and washed with saline solution (NaCl 0.9%) for three times. Tucuma extracts (0.25, 0.5, MIC, 1,5 x MIC) were added in wells and incubated at 37C° for 24h. After this, the TSB and tucumã extracts were removed, washed twice with NCl 0,9% and 100µl of 0.5 % crystal violet solution (Sigma Chemical Co) added to each well, and then washed with distilled water twice. Microplates inverted and vigorously tap on paper towels to remove any excess liquid and air dried. 200 µl of 95% ethanol poured in wells. Biofilm stains solubilized at room temperature. After shaking and pipetting of wells, 200 µl of the solution from each well transferred to a new microtiter plate and biofilm formation was assayed by measuring the absorbance of the crystal violet solution at 580 nm (optical density – OD<sub>580</sub>). Only culture media (without microorganisms) was used as negative control. Each assay was performed three times and mean absorbance values were used to measure the inhibition of biofilm formation (%) as follows: (mean OD<sub>580</sub> of treated well / OD<sub>580</sub> of untreated well) / 100.

#### *Quantification of extracellular dsDNA by PicoGreen® dye*

To test the tucumã extracts acute effect on susceptible microorganisms the concentrations of extracellular dsDNA fragments were evaluated at MIC peel and pulp extracts concentrations. An fluorimetric assay was adapted from Batel et al (1999) and Georgiou et al (2009) to eukaryotic cells using fluorochrome PicoGreen® dye. PicoGreen® dye react to double-strand DNA (dsDNA) in the presence of equimolar concentrations of single-strand DNA and RNA with minimal effect on the quantification results. The method has been previously validated by measuring DNA integrity in human lymphocytes from patients after irradiation and chemotherapy, in

cell lines and to evaluation of free DNA in human plasma as diseases biomarker (Becerril et al., 2002; Patel et al., 2007; Illanes et al., 2009; Ha et al., 2011; Swarup et al., 2011). The assessment of fluorescence changes of the PicoGreen dye DNA ligand is also used to high-throughput screening assay for the discovery of nuclease inhibitors in *Streptococcus pneumoniae* (Peterson et al., 2013). The test described here was performed in fluorescence microplates 96-well using Quant-iT™ PicoGreen® kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The *E. faecalis* (ATCC 29212) vancomycin susceptible was used to validate this method. A DNA denaturation kinetic (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 minutes) was determined using cell cultures ( $5 \times 10^5$  CFU/ml) without any additional treatment (negative control), cells exposed to vancomycin (3mg/mL) and calf Lambda DNA standard dissolved in TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5). An additional analysis of dsDNA level was performed after 24h of exposition to evaluate the level of dsDNA. In drug-treated cells as well as tucumã extracts it was expected dsDNA fluorescence decreasing due cellular mortality and compounds degradation including dsDNA to ssDNA and nucleotides in the samples.

In the cell samples used to dsDNA kinetic assay the PicoGreen® dye was immediately added in the culture medium. PicoGreen® dye was diluted 1:200 with TE buffer and incubated with microbial cells in the dark at room temperature for 5 min. To minimize photobleaching effects, time for fluorescence measurement was kept constant for all samples. Fluorescence emission of PicoGreen alone (blank) and PicoGreen with DNA were recorded at 528nm using an excitation wavelength of 485nm at room temperature (25°C) in a SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA.



### *Measurement of ROS in microbial cell cultures*

The tucumã extracts that are rich in antioxidant compounds change the balance between ROS and antioxidant endogenous and exogenous from the microorganisms and the standardized culture medium constitution. This alteration could to produce a REDOX imbalance to microorganisms. Therefore, the ROS production was determined after 24 hours of tucumã extracts exposition using the non-fluorescent cell permeating compound 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. In this technique the DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. After the designated treatment time, the cells were treated with DCFDA (10 µM) for 60 minutes at 37°C. The fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525nm (SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). All tests were performed in triplicate for each of the samples tested.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using SPSS software, version 19.0. The results obtained were presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post hoc* test was applied for statistical analysis with the level of significance  $p < 0.05$ .

## Results

The pulp and peel tucumã extracts were tested for antimicrobial activity against 37 clinically important microorganisms using the disk diffusion method. Considerably inhibitory activity was observed to four microorganisms: *E. faecalis*, *B. cereus*, *C. albicans* and *L. monocytogenes*. The IZD and MIC values of these microorganisms are described in Table 2. In the *E. faecalis* and *B. cereus* pulp tucumã present a higher inhibitory action than peel extracts. On the other hand, in *L. monocytogenes* and *C. albicans* the peel tucumã extract was more effective in the growing inhibition effect. *E. faecalis* presented higher MIC values and *B. cereus* presented lower MIC for both tucumã extracts when compared to other microorganisms. However, *L. monocytogenes* presented lower MIC to pulp than peel tucumã extracts whereas in the *C. albicans* the lower MIC value was found to peel tucumã extract.

**Table 2** Antimicrobial activity of peel and pulp tucumã extracts

Strains	IZD (mm)			MIC (mg/mL)	
	C+	Peel	Pulp	Peel	Pulp
<i>Enterococcus faecalis</i>	26.9±1.4	8.1±0.0	8.6±0.2	46.5	46.5
<i>Bacillus cereus</i>	25.8±0.2	13.5±0.5	14.2±0.9	16.6	16.6
<i>Listeria monocytogenes</i>	19.0±0.9	10.6±0.3	9.6±0.1	46.5	16.6
<i>Candida albicans</i>	18.8±0.9	10.22±0.8	8.3±1.3	16.6	46.5

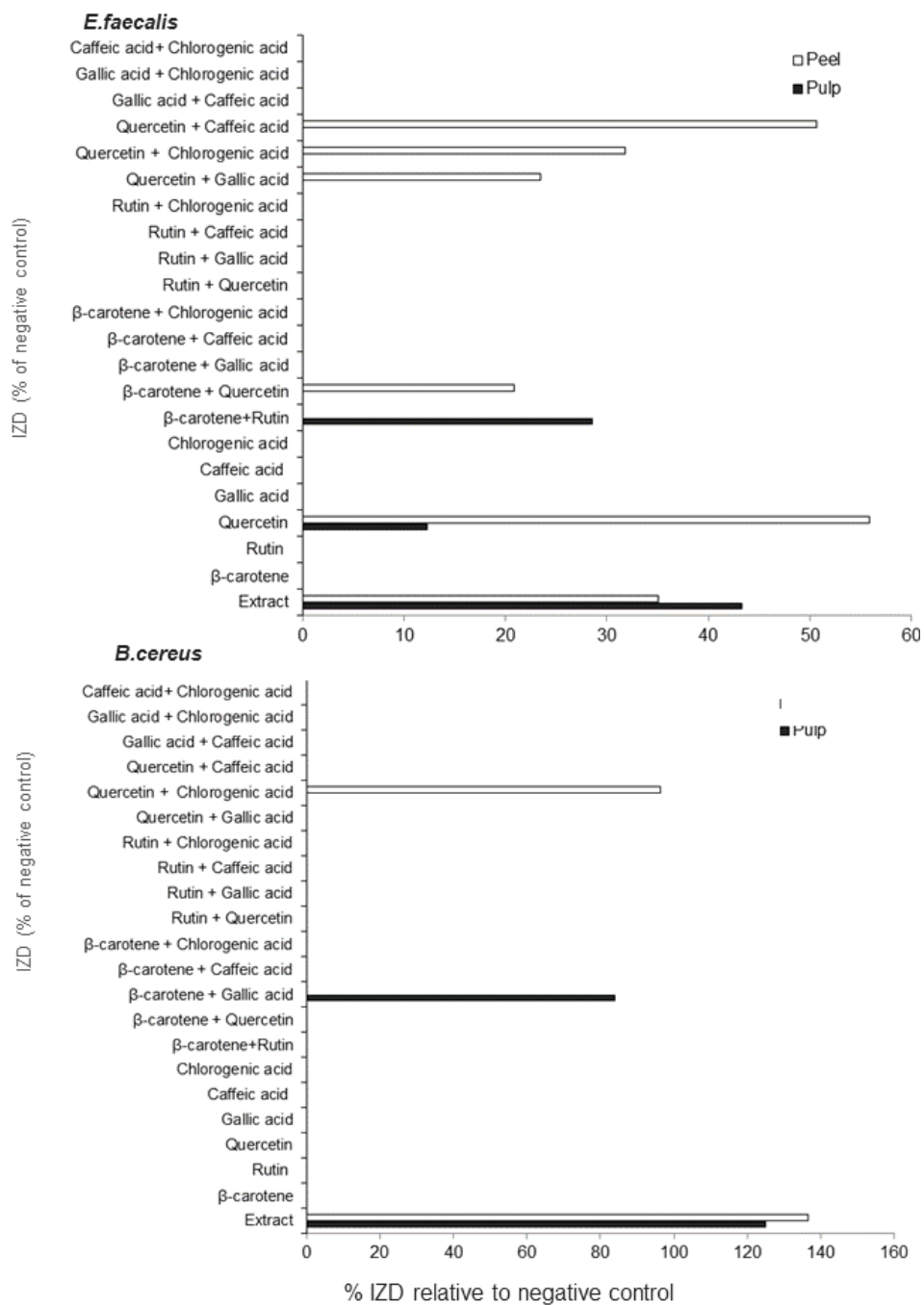
IZD= inhibitory zone diameter (mm); MIC= minimal inhibitory concentration;  
 ± - mean standard deviation of triplicates

A complementary test was performed to evaluate the potential antimicrobial contribution of the main chemical compounds (separately and in combination) presented in tucumã extracts on antimicrobial activity. The concentrations of compounds tested here were similar to identified in pulp and peel tucumã extracts by chromatography (Table 1) was considering as reference the MIC dose to each microorganism.

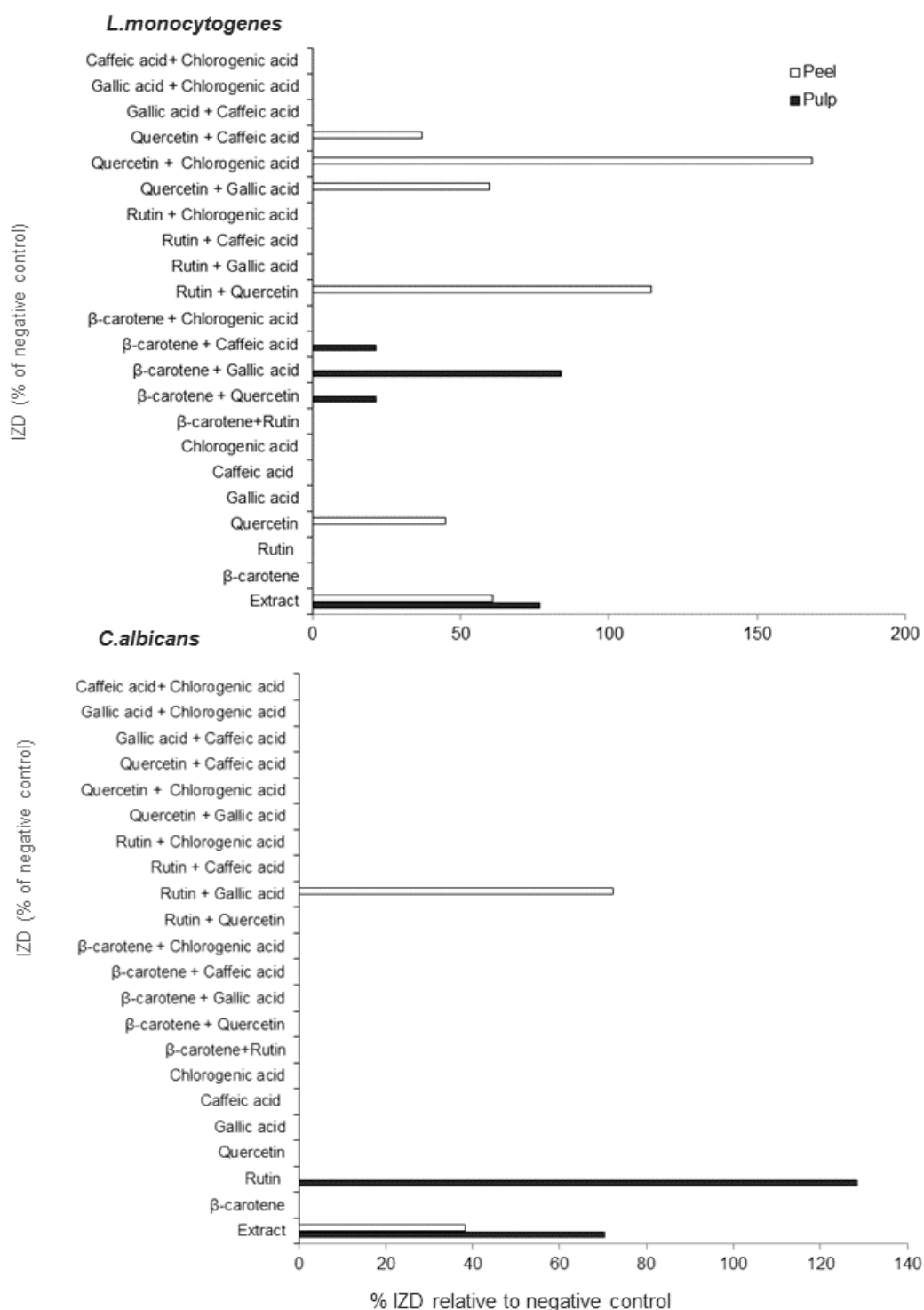
The inhibitory activity of chemical compounds was microorganism specific (Figures 1, 2). *E. faecalis* (Fig.1) presented higher susceptibility to quercetin in both peel and pulp extracts concentrations and in combination with  $\beta$ -carotene at concentrations found in pulp extracts and in combination with gallic acid, chlorogenic acid and  $\beta$ -carotene at concentrations found in peel extracts. Rutin as well as the other separately compounds did not affect the *E. faecalis* growing. On the other hand, quercetin at concentration found in peel extract presented a higher inhibitory activity even when compared to crude peel tucuma extract.

The *B. cereus* (Fig. 1) presented inhibition just in when treated to gallic acid plus  $\beta$ -carotene at concentration found in pulp tucumã extract and when treated to chlorogenic acid plus quercetin at concentration found in peel tucumã extract.

The *L. monocytogenes* (Fig. 2) showed high susceptibility when exposed to  $\beta$ -carotene combined with gallic acid, caffeic acid and quercetin at pulp extracts concentrations. Considering the chemical compounds concentrations found in peel tucumã extracts this microorganism showed high susceptibility to quercetin separately and combined with gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and rutin. Quercetin and quercetin plus  $\beta$ -carotene including presented an inhibitory activity greater than found in tucumã extracts.



**Figure 1** The *in vitro* antimicrobial activity of the main chemical compounds present in peel and pulp tucumã extracts at MIC concentration. Data represent the relative percent of diameter inhibition zone (mm) related to negative control group. (The chemical compound concentrations are similar to found in each tucumã extracts and were calculated based in data presented in Table 1.

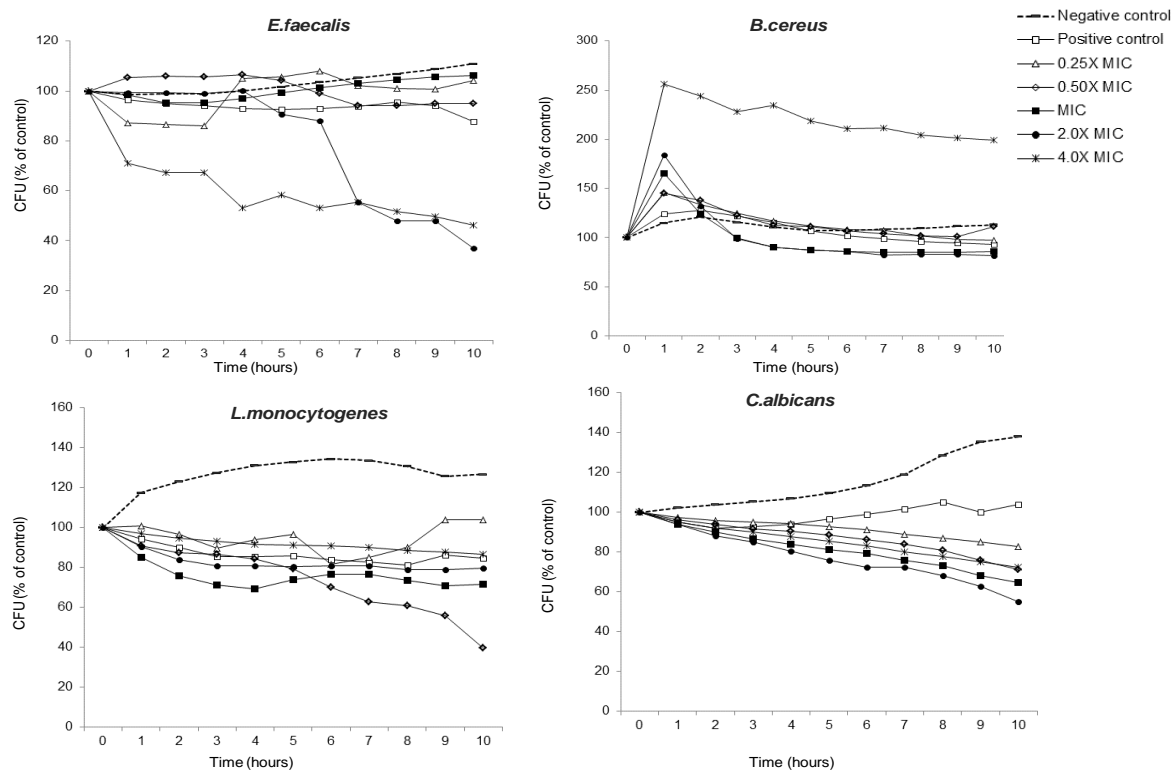


**Figure 2** The *in vitro* antimicrobial activity of the main chemical compounds present in peel and pulp tucumã extracts at MIC concentration. Data represent the relative percent of diameter inhibition zone (mm) related to negative control group. The chemical compound concentrations are similar to found in each tucumã extracts and were calculated based in data presented in Table 1.

The effect of chemical compounds in *C. albicans* growing (Fig.2) was more attenuated when compared to other bacterial microorganisms. Just rutin (alone) at concentration found in pulp extract and rutin plus gallic acid presented inhibitory activity in this organism.

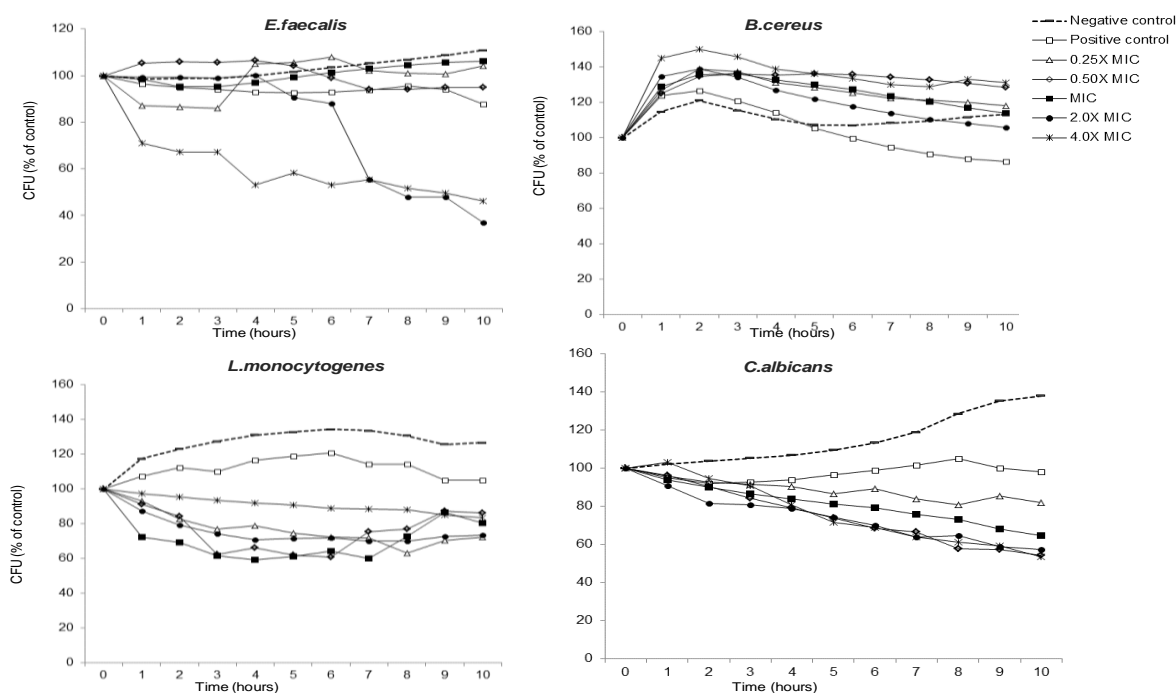
After the identification of susceptible microorganisms to tucumã extracts killing curves of these microorganisms were performed considering the following concentrations of treatments: 0.25 x MIC, 0.50 x MIC, MIC and 2 x MIC, and 4 x MIC (Figures 3 and 4).

*E. faecalis* and *C. albicans* showed viability decreasing dose-dependent when exposed to both tucumã extracts. However, the extracts and positive control did not present a large effect on *B.cereus* viability. *L. monocytogenes* also showed viability decreasing when exposed to tucumã extracts. However, the lower tucumã concentrations (0.25 x MIC and 0.50 x MIC) presented more accentuated mortality in this strain. At contrary, the higher peel tucumã concentration (4 x MIC) increased significantly the *B. cereus* viability when compared to negative control group and treatments (Figures 3 and 4). In this bacteria viability decreasing began to occur only from 7 hours of exposition at MIC concentration.



**Figure 3** Killing curve of microorganisms susceptible to peel tucumã extracts at four concentrations based in MIC: 0.25X MIC, 0.50X MIC, MIC, 2X MIC and 4X MIC. Results are presented as relative % of negative control group.

The inhibition capacity in the biofilm formation by *C. albicans* by tucumã extracts was also evaluated. The tucumã extracts at MIC and 1.5 x MIC concentrations decreased significantly the biofilm formation (Figure 5). However, this inhibition was relatively low (approximately 20%).

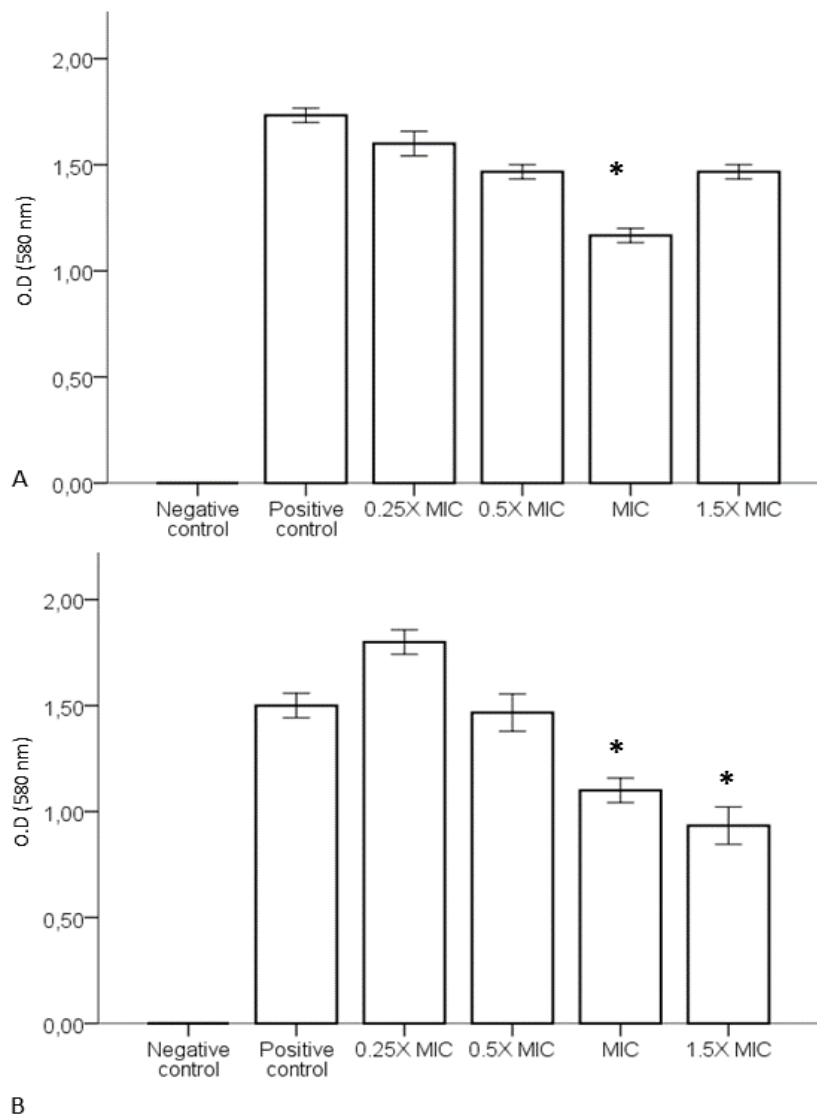


**Figure 4** Killing curve microorganisms susceptible to pulp tucumã extracts at four concentrations based in MIC: 0.25X MIC, 0.50X MIC, MIC, 2X MIC and 4X MIC . Results are presented as relative % of negative control group.

Two complementary protocols were performed to observe if the antimicrobial effect of tucumã extracts was related to disruption of REDOX homeostasis. The effect on extracellular dsDNA concentrations and the ROS levels in culture medium.

To analyze if the extracts caused cytotoxic acute effect on microorganisms we used a fluorimetric analysis using DNA PicoGreen<sup>®</sup> dye. The method standardization was performed considering *E. faecalis* as reference organism. To perform this assay we tested if the kinetic of dsDNA fluorescence were maintained with little variation in the first 90 minutes of kinetic test using three different calf DNA concentrations (0.0001, 0.001 and 0.01  $\mu\text{g/mL}$ ).

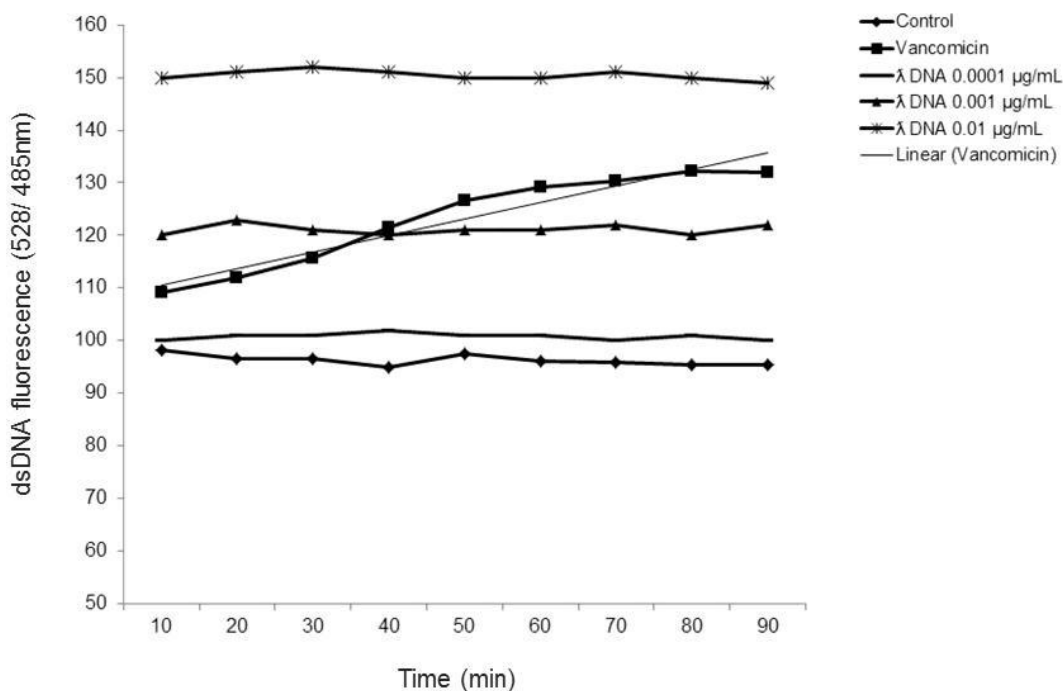




**Figure 5** Effect of *C. albicans* inhibition biofilm formation by tucuma extracts (A) peel and (B) pulp at four concentrations based in MIC: 0.25X MIC, 0.50X MIC, MIC and 1.5X MIC. Results are presented as relative % of negative control group. \* = Indicates statistical differences among treatments comparing to positive control group evaluated by analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test.

The *E. faecalis* exposed and not exposed to vancomycin as positive and negative control respectively was also tested. As can see in Figure 6 the dsDNA fluorescence remained similar in negative control group as well as in the different calf DNA concentrations indicating no relevant degradation of DNA or PicoGreen<sup>®</sup> dye activity in the next 90 minutes from PicoGreen<sup>®</sup> addition in cell culture medium. However, *E. faecalis* samples exposed to vancomycin presented time-dependent increasing in dsDNA fluorescence ( $Y=3.159X+ 107.35$ ;  $r^2= 0.933$ ). This result indicates that vancomycin effect on *E. faecalis* can be observed in a short period after exposition. From this result, a similar protocol was applied to evaluate the effect on tucumã extracts on dsDNA extracellular concentrations in the four susceptible microorganisms (Figure 7).

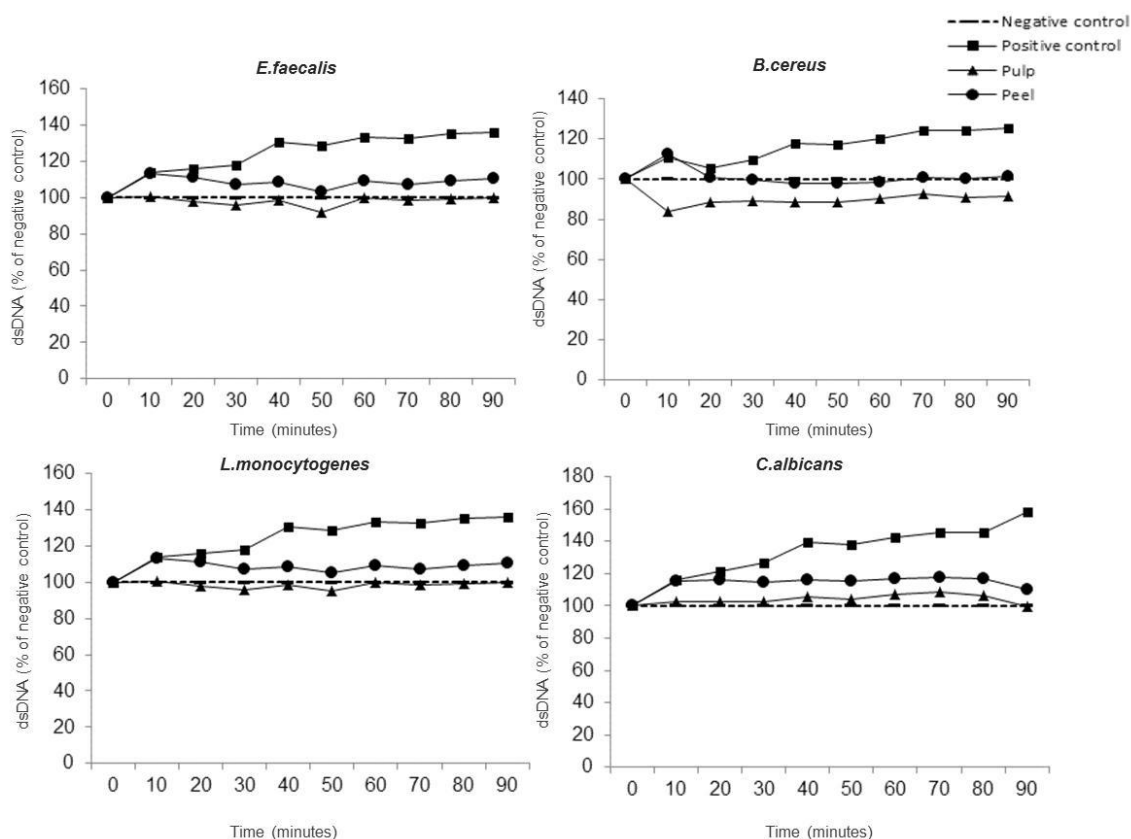
All antimicrobial drugs (vancomycin to *E. faecalis* and *B.cereus*; amoxilin clavulate to *L. monocytogenes* and isoconazole to *C. albicans*) increased the dsDNA extracellular level in a time-dependent way. However, a small increase in the dsDNA extracellular was observed in *E. faecalis*, *L. monocytogenes* and *C. albicans* treated with peel tucumã extract. No effect on dsDNA concentration was observed in these microorganisms when treated with pulp tucumã extracts. In the *B.cereus* was not detecting any effect on dsDNA extracellular realizing when this microorganism was treated with pulp and peel tucumã extracts. These results suggest that the potential antimicrobial tucumã effect is slower than antimicrobial drugs used as control and potentially did not occur from bacteriolitic pathway.



**Figure 6** Curve of dsDNA fluorescence measured by PicoGreen dye® considering three calf DNA concentration and *E.faecalis* exposed and no exposed to vancomycin.

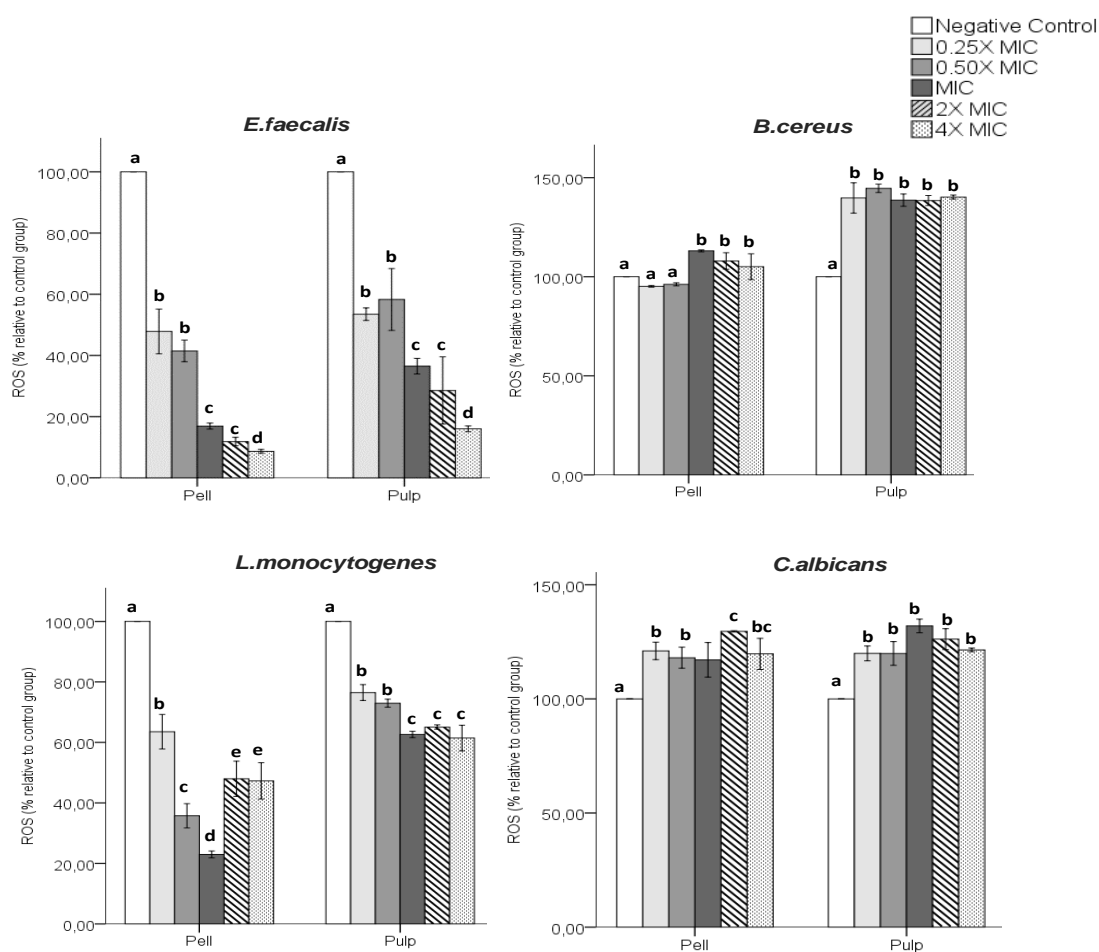
The ROS levels in culture medium treated with pulp and peel tucumã extracts were quantified considering the following concentrations: 4X MIC, 2X MIC, MIC, 0.5 x MIC and 0.25 x MIC. The relative percent of ROS were calculated in relation to ROS levels observed in each control group (representing 100%) of four microorganisms studied (Figure 8).

After 24 hours of tucumã extracts exposition *E. faecalis* showed lower ROS levels compared to negative control group (Fig. 8A). The ROS concentration trended to presence an inverse correlation with pulp and peel tucumã extracts concentrations, namely high levels of extracts decreased levels of ROS in the culture medium.



**Figure 7** Kinetic curve of extracellular dsDNA releasing microorganisms susceptible to peel tucumã extracts to peel and pulp tucumã extracts at MIC concentration. The dsDNA was measured using DNA PicoGreen dye and the results represent the dsDNA fluorescence relative to negative control group.

The *L. monocytogenes* cultures also showed decrease in ROS levels after 24 hours comparing to negative control group. However, ROS levels increased significantly in *B. cereus* and *C. albicans* when compared to negative control groups. In *C. albicans* was also observed a trend to decrease the ROS levels with the elevation of tucumã extracts concentrations.



**Figure 8** Reactive Oxygen Species (ROS) concentrations microorganisms susceptible to peel tucumã extracts after 24 hours exposition to peel and pulp tucumã extracts at four concentrations based in MIC: 0.25X MIC, 0.50X MIC, MIC, 2X MIC and 4X MIC. Different letters indicate statistical differences among treatments evaluated by analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test.

## Discussion

The results described here suggest for the first time that tucumã extracts present an antimicrobial activity against three Gram-positive bacteria (*E. faecalis*, *B. cereus* and *L. monocytogenes*) as well antifungal activity against *C. albicans*. Tucumã is very rich in chemical compounds as polyphenols. Probably, the antimicrobial effect of tucumã fruit is associated to its chemical composition that includes several types of polyphenol molecules. These compounds in the last 20 years have been studied for their potential preventive effect of several chronic diseases as cardiovascular morbidities and cancer (Quideau et al., 2011). Moreover investigations also described that polyphenols that are secondary metabolites produced by higher plants have antibacterial, antiviral and antifungal properties (Daglia, 2012).

However, as the tucumã is a fruit that has a complex nutritional matrix we consider important to evaluate the contribution of the main chemical compounds present in these extracts in the antimicrobial activity described here. Further, the relevant to contribute in the elucidation of mechanism of action related to antimicrobial activity of this fruit. For this reason, in this study was also evaluated the antimicrobial activity of six compounds (separately and in combination) in similar concentrations found in MIC tucumã extracts. The results showed that antimicrobial activity is influenced by the chemical compounds studied here but this activity is specific-organism dependent and generally related to combination of two chemical compounds. Despite the tucumã has a great concentration and number of carotenes (De Rosso e Mercadante, 2007; Garcia et al., 2013) the antimicrobial activity of this

molecule was found just in combination of other molecules in the Gram positive bacteria that were susceptible to tucumã extract.

These results support the idea that antimicrobial effect found in tucumã fruit is not homogeneous and possibly act on different mechanisms to induce growing inhibition and dead in each specific microorganism. Initially, the protective activity of chemical compounds present in fruit and vegetables as polyphenols and carotene was attributed the capacity of these compounds to act as free radical scavengers. However, in most recent years investigations showed that compounds as polyphenols are able to interact with signal transduction pathways and cell receptors that can interrupt the microbial growing and/or to induce cell death (Landete, 2012; Daglia, 2012). The assays evaluating the acute effect on microorganisms leading to dsDNA extracellular releasing and that evaluated ROS concentration in the culture medium after 24 h of tucumã exposition reinforce the idea that antimicrobial tucumã activity occur from different mechanism depending on the type of microorganism. In these terms is necessary to discuss the potential antimicrobial effect on each microorganism that presented susceptibility to tucumã extracts.

Intestinal microbiota plays an important, if not crucial, role in the metabolism of chemicals delivered with food. However, some microorganisms that are part of the microbiota, as *E. faecalis* can also act as opportunistic pathogens and are among the leading causes of nosocomial infections (Jett and Huycke, 1994; Szemes et al., 2010). *E. faecalis* represents an important clinical problem due to a number of virulence factors and this microorganism is among the most antibiotic resistant bacteria known (Jett and Huycke, 1994). Investigations showed that the molecular mechanism associated to enterococcal infections pathogenesis involves oxidative stress.

The *E. faecalis* exhibits high resistance to oxidative stress since in contrast to many other streptococci, contains a catalase (KatA) and also Manganese superoxide dismutase manganese-dependend (MnSOD). These are antioxidatives mechanisms of protection mainly against hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and superoxide (Baureder et al., 2012; Szemes et al., 2010). *E. faecalis* also produces free radicals derived from oxygen that is important for its survival (Huycke and Gilmore, 1996). In turn, the increase in oxidative stress can induce oxidative damage to DNA of surrounding eukaryotic cells leading to clinically important mutations that can contribute to the pathogenesis of some chronicle diseases as colorectal cancer and periodontitis (Wang and Huycke, 2007).

Therefore, the antimicrobial effect of tucumã extracts on *E. faecalis* can be considered relevant. The complementary results described here showed that the antimicrobial effect of tucumã on *E. faecalis* was in part related to quercetin separately and in combination with caffeic, gallic and chlorogenic acids and with  $\beta$ -carotene. These results corroborate previous studies as performed by Jeong et al, 2009 that investigated the effect of some specific polyphenols (one flavone and 11 hydroxyflavones) on *E. faecalis* viability and suggested that these compounds could be effective antimicrobials.

The analysis of dsDNA releasing to extracellular compartment showed that the tucumã effect on *E. faecalis* was not acute as observed in vancomycin treatment. Further, the ROS concentrations in culture medium remained inversely proportional to quantity of tucumã extracts after 24 hours. Considering all these results it can be suggested that the greatest amount of antioxidants in the culture medium could cause an REDOX imbalance that could contribute to growth inhibition and / or death of the organism.



*B. cereus* is a microorganism that is commonly associated with large outbreaks of foodborne illness. A high number of bacteria (around one million bacteria per gram of food) must be consumed in order to cause gastroenteritis (Stenfors et al., 2008). Therefore, this microorganism encounters oxidative agents and conditions in a range of settings including environments rich in oxidative compounds as equipments that are regularly cleaned and disinfected and inside macrophages that produce these molecules to protect the organism.

To avoid damage from oxidative molecules *B. cereus* produce catalases and thioredoxins (Mols and Abee, 2011) and superoxide dismutases (Wang et al., 2007). However, tucumã extracts that present antioxidant activity inhibited the *B. cereus* growing and part of this activity could be explained by quercetin plus chlorogenic acid and  $\beta$ -carotene plus gallic acid. The potential effect of these compounds in the antimicrobial activity of tucumã extracts is corroborated by some previous studies that also described effect against *B. cereus* by plants that present some of these compounds in their extracts including *Daucus carota* (Kumarasamy et al., 2005), *Echinophora platyloba* (Saei-Dehkordi et al., 2012), *Pistachia vera* (Rajei et al., 2010) and *Pinus cembra* (Apetrei et al., 2011).

However, at contrary to observed in *E. faecalis*, after 24 h the culture medium of *B. cereus* treated with tucumã extracts showed higher ROS levels when compared to no treated control group. The generation process of ROS can be monitored using fluorescence methods as the 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). This is a well-established molecule to detect and quantify mainly hydrogen peroxide intracellular produced. Therefore, DCFHDA/DCFH assay have been used to study free radical production in a variety of systems (Robinson et al., 1988) and measures mainly hydrogen peroxide. Some flavonoids as quercetin under certain reaction

conditions can also display pro-oxidant activity through superoxide radical and hydrogen peroxide production (Kessler et al., 2003). Therefore, we cannot discard that the higher ROS levels observed in *B. cereus* treated with tucumã extracts is consequence of interaction between some metabolic molecules and chemical compounds that generally have antioxidant properties. Complementary studies need to be performed to elucidate this results and the relevance to antimicrobial activity against *B. cereus* of tucumã extracts.

The other microorganism susceptible to tucumã extracts was the *L. monocytogenes* a facultative anaerobic bacterium that is able to survive in presence of oxygen. Despite the *Listeria* infection to be relatively uncommon pathogen is highly virulent and 20 and 30 percent of clinical infections result in death, the fatality rate can be as high as 30% among at-risk people (Ramaswamy et al., 2007). The tucumã extracts showed inhibitory activity to *Listeria* and the main compounds that contributed with this activity was the quercetin plus chlorogenic acid combination. Previous studies with plants extracts rich in quercetin as white grape (Corrales et al., 2010) and with chlorogenic acid as coffee (Mueller et al., 2011) that show antimicrobial activity against *L. monocytogenes* corroborating the results described here.

Similar to observed in *E. faecalis*, the addition of tucumã extracts in the culture medium remained ROS levels at a lower concentration compared to negative control group. In the study performed by Muller et al (2011) the antimicrobial activity found in coffee that present chlorogenic acid in this composition was related to capacity of coffee extracts to produce peroxide hydrogen. This suggestion was tested for the authors that observed which the addition of catalase completely abolished the antimicrobial activity.

The overall results suggest that antimicrobial activity against three important Gram-positive microorganisms by tucumã extracts occurs through the state unbalance REDOX changing the concentrations of hydrogen peroxide. However, complementary studies need to be performed to clarify the biological pathways related to this action.

Besides the antibacterial activity, tucumã extracts also showed antifungal activity against *C. albicans*. This yeast is a causal agent of opportunistic oral, genital and bloodstream infections in humans leading a important morbi-mortality in immunocompromised and nosocomial patients. In addition, *C. albicans* may form biofilms on the surface of implantable medical devices, such venous, urinary and central catheters. The results showed an inhibitory effect of *C. albicans* when exposed to tucumã extracts. Anti-biofilm activity of tucumã extracts was also observed mainly at MIC and 1.5X MIC concentrations found in peel tucumã extract.

The anti-candida role of main chemical compounds found in tucumã extracts showed higher inhibitory effect of rutin on *C. albicans* growing when treated at similar concentration found in peel tucumã extracts. The combination of rutin plus gallic acid also presented similar activity against *Candida*. These results are in agreement a previous study performed by Han (2009) described therapeutic effect of rutin on septic arthritis caused by *C. albicans*. Previous studies, as performed by Buzzini et al. (2008) and Hong et al (2011) described anti-candidal effect of gallic acid. Even though, the actual mechanism of action of the gallic acid on yeast cells has not been widely studied. Hong et al (2011) postulated that its antifungal activity is by disrupting the structure of the cell membrane and inhibiting the normal budding process due to the destruction of the membrane integrity. The results obtained here showed some dsDNA releasing to extracellular medium similar to positive control (isconazole)

even more attenuated. However, a higher ROS concentration was observed in all treatments with tucumã extracts when compared to negative control group. Therefore, these results suggest that tucumã effect also involves REDOX imbalance that leads to oxidative stress state.

In conclusion, in this study the tucumã extracts possessed a significant antibacterial activity against three important Gram-positive bacteria and antifungal activity against *C. albicans*. As these microorganisms present great facility for the production of resistant strains these effects could to be considered relevant. The antimicrobial mechanism of action of tucumã seems to involve REDOX imbalance that disrupt the microorganism growing and/or causes increase in the mortality. However, this effect presents some specificity to each microorganism involving the role of different chemical compounds found in tucumã extracts.

### **Acknowledgments**

The authors thank the financial support of CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul).

### **References**

- Apetrei CL, Tuchilus C, Aprotosoiaie AC, Oprea A, Malterud KE, Miron A. Chemical, antioxidant and antimicrobial investigations of L. bark and needles. *Molecules* 2011; 16(9):7773-88.
- Ballé W. *Footprints of the Forest: Ka'apor Ethnobotany- The historical ecology of plant utilization by na amazonian people*. New York: Columbia University Press; 1994.

Batel R, Jaksić Z, Bihari N, Hamer B, Fafandel M, Chauvin C, Schröder HC, Müller WE, Zahn RK. A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). *Anal Biochem*, 1999; 1;270(2):195-200.

Baureder M, Reimann R, Hederstedt L. Contribution of catalase to hydrogen peroxide resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* 2012;331(2):160-4.

Buzzini P, Arapitsas P, Goretti M, Branda E, Turchetti B, Pinelli P, Ieri F, Romani A. Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Rev Med Chem*, 2008; 8(12):1179-87.

Cisowska A, Wojnicz D, Hendrich AB. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat Prod Commun* 2011;6(1):149-56.

Corrales M, Fernandez A, Vizoso PMG, Butz P, Franz CM, Schuele E, Tauscher B. Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food Chem Toxicol* 2010;48(12):3471-6. doi: 10.1016/j.fct.2010.09.025. Epub 2010.

Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26(5):343-56. Review. Erratum in: *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(2):181.

Daglia M, Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, 2012; 23(2):174-81.

De Rosso VV, Mercadante AZ. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:5062-5072.

Garcia LFM, Sagrillo MR, Souza-Filho OC, Ribeiro EE, Boligon AA, Athayde ML, Barcelos RP, Morel AF, Mostardeiro CP, Cadoná FC, da Cruz IBM. The *in vitro* antioxidant activity and cytotoxicity of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, m.) peel and pulp extracts. *Intern Food Res (subject)* 2013.

Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). *Nat Protoc*, 2009; 4(2):125-31.

Gonçalves AESS, Lajolo FM, Genovese MI. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 4666–4674.

Ha TT, Huy NT, Murao LA, Lan NT, Thuy TT, Tuan HM, Nga CT, Tuong VV, Dat TV, Kikuchi M, Yasunami M, Morita K, Huong VT, Hirayama K. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoSOne* 2011; 6(10): e25969.

Han Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(2):207-11. doi: 10.1016/j.intimp.2008.11.002. Epub 2008.

Herndon CN, Uiterloo M, Uremaru A, Plotkin MJ, Emanuels-Smith G, Jitan J. Disease concepts and treatment by tribal healers of an Amazonian forest culture. , 2009; 12;5:27. doi: 10.1186/1746-4269-5-27.

Hong LS, Darah I, Kassin J, Sulaiman S. Journal Gallic acid: An anticandidal compound in hydrolysable tannin extracted from the barks of *Rhizophora apiculata* Blume. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011; 01(06): 75-79.

Huycke MM, Gilmore MS. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. In: Hraud T, Bouvet A, Leclercq R *et al.* (eds) XIII Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Paris, France: Plenum Press Div Plenum Publishing Corp 1996; 781–784.

Hsu CY, Lin MH, Chen CC, Chien, SC, Cheng YH, Su IN, Shu JC. Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin- non- susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 63: 236- 247.

Illanes S, Parra M, Serra R, Pino K, Figueroa-Diesel H, Romero C, Arraztoa JA, Michea L, Soothill PW. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn*, 2009; 29(12):1118-22.

Jeong KW, Lee JY, Kang DI, Lee JU, Shin SY, Kim Y. Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *J Nat Prod*, 2009; 72(4):719-24.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 462–467.

Kessler M, Ubeaud G, Jung L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55(1):131-42.

Kumarasamy Y, Nahar L, Byres M, Delazar A, Sarker SD. The assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota* L) seeds. *J Herb Pharmacother*, 2005; 5(1):61-72.

Landete JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism and health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012; 52(10): 936- 48.

Lee KA, Song YC, Kim GY, Choi G, Lee YS, Lee JM, Kang CY. Retinoic acid alleviates Con A- induced hepatitis and differentially regulates effector production in NKT cells. *Eur J Immunol* 2012; 42(7): 1685- 94.

Merritt JH, Kadouri DE, Toole GA. Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology* 2005; 1B.1,1- 1B. 1, 17.

Mishra S, Imlay J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2012;525: 145-160.

Mols M, Abee T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 2011; 13(6), 1387–1394.

Mueller U, Sauer T, Weigel I, Pichner R, Pischetsrieder M. Identification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a major antimicrobial component in coffee. *Food Funct* 2011; 2(5):265-72.

Nahar L, Byres M, Delazar A, Sarker SD. The assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota* L) seeds. *J Herb Pharmacother* 2005; 5(1):61-72.

Patel HH, Zhang S, Murray F, Suda RY, Head BP, Yokoyama U, Swaney JS, Niesman IR, Schermuly RT, Pullamsetti SS, Thistlethwaite PA, Miyanojara A, Farquhar MG, Yuan JX, Insel PA. Increased smooth muscle cell expression of caveolin-1 and caveolae contribute to the pathophysiology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *FASEB J*, 2007; 21(11):2970-9.

Peterson EJ, Kireev D, Moon AF, Midon M, Janzen WP, Pingoud A, Pedersen LC, Singleton SF. Inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* Surface Endonuclease EndA Discovered by High-Throughput Screening Using a PicoGreen Fluorescence Assay. *J Biomol Screen*, 2013; 18(3):247-57.

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Chem Int* 2011; 50: 586-621.

Rajaei A, Barzegar M, Mobarez AM, Sahari MA, Esfahani ZH. Antioxidant, antimicrobial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(1):107-12. Doi: 10.1016/j.fct.2009.09.023. Epub 2009.

Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. "Listeria – review of epidemiology and pathogenesis." *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40 (1):4–13.

Robinson JP, Bruner LH, Bassoe CF, Hudson JL, Ward PA, Phan SH. Measurement of intracellular fluorescence of human monocytes relative to oxidative metabolism. *J Leukoc Biol* 1988; 43(4):304-10.

Saei-Dehkordi SS, Fallah AA, Saei-Dehkordi SS, Kousha S. Chemical composition and antioxidative activity of *Echinophora platyloba* DC. essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food-borne pathogens and spoilage organisms. *J Food Sci* 2012; 77(11):M631-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02956.x. Epub 2012.

Shanley P, Medina G, editors. *Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica*. Belém; 2005. p. 215- 223.

Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 2008; 32:579-606.

Szemes T, Vlkova B, Minarik G, Tothova L, Drahovska H, Turna J, Celec P. On the origin of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms in *Enterococcus faecalis*. Redox Report 2010; V15, N5. doi: 10.1179/135100010X12826446921581.

Swarup V, Srivastava AK, Padma MV, Rajeswari MR. Quantification of circulating plasma DNA in Friedreich's ataxia and spinocerebellar ataxia types 2 and 12. DNA Cell Biol 2011; 30(6): 389- 94.

Walter P. 10 years of functional foods in Europe. Int J Vitam nutr Res 2008; 78(6): 253- 60.

Wang Y, Wang H, Yang CH, Wang Q, Mei R. Two distinct manganese-containing superoxide dismutase genes in *Bacillus cereus*: their physiological characterizations and roles in surviving in wheat rhizosphere. FEMS Microbiol Lett 2007; 272(2):206-13.

Wang XM, Huycke MM. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. Gastroenterology 2007; 132:551-561.

World Health Organization Traditional Medicine. Growing needs and potencial. WHO Policy Perspective on Medicine 2002; No 2.



## 4 DISCUSSÃO

Os resultados aqui descritos sugerem, pela primeira vez que os extratos de tucumã apresentam uma atividade antimicrobiana para três bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) bem como atividade antifúngica para a *Candida albicans*. O tucumã é muito rico em compostos químicos, como polifenóis. Assim, provavelmente, o efeito antimicrobiano deste fruto tucumã está associado à sua composição química, que inclui vários tipos de polifenóis. Nos últimos 20 anos estes compostos têm sido estudados por seu potencial efeito preventivo em doenças crônicas não transmissíveis incluindo, morbidades cardiovasculares e diversos tipos de neoplasias (QUIDEAU et al., 2011). Além disso, investigações descreveram que os polifenóis, que são metabólitos secundários produzidos por plantas superiores possuem propriedades antibacteriana, antiviral e antifúngica (DAGLIA, 2012).

No entanto, como o tucumã é um fruto que possui uma matriz nutricional complexa, foi considerado importante avaliar a contribuição dos principais compostos químicos polifenólicos presentes nesses extratos na atividade antimicrobiana aqui descrita. Além disso, o estudo também buscou contribuir na elucidação dos mecanismos de ação relacionados com a atividade antimicrobiana do fruto nos quatro microrganismos suscetíveis. Para tanto, foi também avaliada a atividade antimicrobiana de seis compostos (separadamente ou em combinação), em concentrações semelhantes ao CIM encontrados nos extratos de tucumã. Os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana é influenciada pelos compostos químicos aqui estudados, mas essa atividade é dependente do microrganismo e, geralmente, relacionada com a combinação de dois compostos químicos.

Uma questão que chamou a atenção foi que apesar do tucumã ter uma grande concentração de carotenos (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; GARCIA et al., 2012) a atividade antimicrobiana desta molécula foi encontrada apenas em combinação com outras moléculas nas bactérias Gram-positivas que estavam suscetíveis ao extrato de tucumã. Na *C. albicans* parece que moléculas de beta-caroteno não influenciam significativamente o seu crescimento e viabilidade.

Estes resultados corroboram com a ideia de que o efeito antimicrobiano encontrado no fruto tucumã não é homogêneo e possivelmente é resultado de

diferentes mecanismos que induzem a inibição do crescimento e a morte em cada microrganismo. Inicialmente, a atividade protetora dos compostos químicos presentes em frutas e vegetais como polifenóis e caroteno foi atribuída à capacidade destes compostos atuarem como captadores de radicais livres. Investigações mais recentes mostraram que compostos como polifenóis são capazes de interagir com vias de transdução de sinais e receptores celulares que pode interromper o crescimento microbiano e/ou induzir a morte celular destes organismos (LANDETE, 2012; DAGLIA, 2012).

Neste primeiro estudo foi verificado se a modulação diferencial do metabolismo oxidativo poderia ser um dos mecanismos antimicrobianos causais associados aos extratos de tucumã. Os ensaios avaliaram os efeitos agudos sobre os microrganismos na liberação de DNA extracelular, e na concentração de ROS no meio de cultura após 24 horas de exposição ao tucumã, reforçaram a ideia de que a atividade antimicrobiana do tucumã ocorre a partir de diferentes mecanismos, dependendo do tipo de microrganismo. Ou seja, não ocorreu um estresse oxidativo homogêneo nos quatro microrganismos, como poderia se pensar inicialmente. Por este motivo, se faz necessário discutir individualmente o potencial efeito antimicrobiano em cada microrganismo que apresentou suscetibilidade aos extratos de tucumã.

A microbiota intestinal desempenha um papel importante no metabolismo dos produtos químicos fornecidos pela alimentação. No entanto, alguns microrganismos que fazem parte da microbiota, como *E. faecalis*, também podem atuar como patógenos oportunistas estando estes entre as principais causas de infecções nosocomiais (JETT; HUYCKE, 1994; SZEMES et al., 2010). *E. faecalis* representa um problema clínico importante, devido a uma série de fatores relacionados ao aumento de sua virulência, o que faz com que este microrganismo apresente um dos mais conhecidos problemas de resistência a antibióticos (JETT; HUYCKE, 1994). Investigações mostraram que o mecanismo molecular associado ao estresse oxidativo envolve infecções patógenas enterocócicas.

Os estudos envolvendo a biologia da resistência do *E. faecalis* mostraram que o papel do estresse oxidativo está associado a graves infecções patogênicas enterocócicas. *E. faecalis* apresenta uma elevada resistência ao estresse oxidativo, pois contém enzimas como a catalase (KatA) e superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD). Estes são mecanismos antioxidantes de proteção especial,

contra o peróxido de oxigênio, radicais hidroxila e superóxido (BAUREDOR et al., 2012; SZEMES et al., 2010). Estes compostos produzem radicais livres derivados do oxigênio, importante para sua sobrevivência (HUYCKE; GILMORE, 1996). Por sua vez, o aumento do estresse oxidativo no ambiente de infecção causado por esta bactéria pode induzir dano oxidativo ao DNA de células eucarióticas levando a mutações clinicamente importantes que, por sua vez, podem contribuir para a patogênese de algumas doenças crônicas como o câncer colorretal e a periodontite (WANG; HUYCKE, 2007).

Portanto, o efeito antimicrobiano dos extratos de tucumã no *E. faecalis* considerado é bastante relevante. Os resultados complementares aqui descritos demonstraram que o efeito antimicrobiano do tucumã no *E. faecalis* foi em parte relacionado com a quercetina separadamente e em combinação com outras moléculas (ácido cafeico e clorogênico e  $\beta$ - caroteno). Estes resultados corroboram estudos anteriores realizados por Jeong e colaboradores, 2008, que investigaram os efeitos de alguns polifenóis específicos (1- flavona e 11- hidroxiflavona) na viabilidade de *E. faecalis* sugeriram que estes compostos podem ser agentes antimicrobianos eficazes.

Entretanto, a análise de liberação de DNA no meio extracelular no *E. faecalis*, que indica cito e genotoxicidade mostrou que os extratos de tucumã não apresentavam efeito agudo, como observado no tratamento com a vancomicina. Além disso, as concentrações de ROS em meio de cultura permaneceram inversamente proporcional à quantidade do extrato de tucumã depois de 24 horas. Considerando esses resultados, pode-se sugerir que a maior quantidade de antioxidantes no meio de cultura provocaria um desequilíbrio no estado REDOX desta bactéria, que poderia contribuir para a inibição do crescimento e/ou morte do microrganismo. Este desbalanço, portanto contribuiria para a atividade antibacteriana dos extratos do tucumã no *E. faecalis*.

O microrganismo *B. cereus* está comumente associado a grandes surtos de doenças transmitidas por alimentos. Para que isso ocorra um elevado número de bactérias (cerca de um milhão de bactérias por grama de alimento) deve ser consumido de modo a causar gastroenterite (STENFORS et al., 2008). Assim, estes microrganismos devem apresentar uma alta taxa proliferativa.

Para evitar danos a partir de moléculas oxidantes, *B. cereus* são também capazes de produzir catalase (MOLS; ABEE, 2011) e superóxido dismutase (WANG

et al., 2007). No entanto, extratos do tucumã que apresentaram atividade antioxidante inibiram o *B. cereus*, sendo que parte desta atividade pode ser explicado pela quercetina e ácido clorogênico e ácido gálico mais  $\beta$ - caroteno. O potencial efeito destes compostos na atividade antimicrobiana é corroborado por alguns estudos anteriores que também descreveram efeito de plantas com alguns destes compostos em seus extratos, incluindo a cenoura (*Daucus carota*), contra o *B. cereus* (KUMARASAMY et al., 2005), *Echinophora platyloba* (SAEI-DEHKORDI et al., 2012), *Pistachia vera* (RAJEI et al., 2010) e *Pinus cembra* (APETREI et al., 2011) contra o *B. cereus*.

Ao contrário do observado em *E. faecalis*, após 24 horas, o meio de cultura com *B. cereus* tratados com os extratos de tucumã mostraram níveis mais elevados de ROS quando comparado ao grupo controle não tratado. O processo de geração de ROS pode ser monitorado utilizando métodos de fluorescência como a 2',7'-dicloro fluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Esta é uma molécula bem estabelecida para a detecção e quantificação de peróxido de hidrogênio produzido principalmente no meio intracelular. Portanto, este ensaio têm sido utilizado para estudar a produção de radicais livres em uma variedade de sistemas (ROBINSON et al., 1988) medindo principalmente o peróxido de hidrogênio. Alguns flavonoides como a quercetina em certas condições também podem exibir atividade pró-oxidante através da produção de peróxido de hidrogênio e radicais superóxido (KESSLER et al., 2003). Portanto, não se pode descartar que os níveis mais elevados de ROS observados no *B. cereus* tratados com os extratos de tucumã seria consequência da interação entre algumas moléculas metabólicas e compostos químicos que geralmente possuem atividades antioxidantes. Ou seja, parece que em *B. cereus* os extratos do tucumã causam uma inversão no meio de cultura passando de um estado antioxidante inicial para um estado altamente oxidativo após 24 horas de cultura. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados para elucidar estes resultados e a relevância para a atividade antimicrobiana dos extratos de tucumã contra *B. cereus*.

Outro microrganismo suscetível aos extratos de tucumã foi *L. monocytogenes*, uma bactéria anaeróbia facultativa, capaz de sobreviver na presença de oxigênio. Apesar da infecção por *L. monocytogenes* ser relativamente rara, o patógeno é altamente virulento e entre 20-30% das infecções resultam em morte, sendo que a taxa de mortalidade é elevada nas pessoas infectadas (cerca de 30%)

(RAMASWAMY et al., 2007). Os extratos de tucumã apresentaram atividade inibitória para *Listeria* sendo a combinação de quercetina e ácido clorogênico a que apresentou efeito antimicrobiano mais contundente. Estudos anteriores com extratos de plantas ricos em quercetina como a uva branca (CORRALES et al., 2010) e ácido clorogênico oriundos como café (MUELLER et al., 2011) mostraram atividade antimicrobiana contra *Listeria* corroborando com os resultados aqui descritos.

Semelhante ao observado no *E. faecalis*, a adição dos extratos de tucumã no meio de cultura mantiveram níveis de ROS em uma concentração mais baixa comparado ao grupo controle negativo para a *L. monocytogenes*. No estudo realizado por Mueller e colaboradores (2011), a atividade antimicrobiana encontrada no café devido a presença do ácido clorogênico foi relacionada com a capacidade de reduzir a produção de peróxido de hidrogênio. Esta sugestão foi testada pelos autores que observaram que a adição de catalase aboliu completamente a atividade antimicrobiana.

Com base nessas considerações os resultados sugerem que a atividade antimicrobiana dos extratos de tucumã contra três importantes microrganismos Gram- positivos ocorre via metabolismo REDOX o que pode ser observado via alteração nos níveis das concentrações de peróxido de hidrogênio e também no efeito genotóxico. No entanto, estudos complementares devem ser realizados para esclarecer as demais vias biológicas ligadas a esta ação.

Além da atividade antimicrobiana, os extratos de tucumã também mostraram uma atividade antifúngica contra *C. albicans*. Esta levedura é um agente causador de infecções oportunistas oral, genital e na corrente sanguínea em humanos observando uma elevada taxa mortalidade em pacientes imunocomprometidos e hospitalares. Além disso, a *C. albicans* pode formar biofilmes na superfície de dispositivos médicos implantáveis via venosa, como catéteres urinários e centrais. Os resultados mostraram um efeito inibitório de *C. albicans* quando expostos aos extratos de tucumã. A atividade antibiofilme foi observada principalmente em concentrações da CIM e 1,5x CIM encontrados no extrato da casca de tucumã.

O papel candidida dos principais compostos químicos encontrados nos extratos de tucumã apresentou a rutina como o maior efeito inibidor no crescimento de *C. albicans* quando tratados com uma concentração semelhante à encontrada nos extratos da casca do tucumã. A combinação de ácido gálico e rutina também apresentou atividade semelhante contra a *C. albicans*. Estes resultados estão de

acordo com um estudo prévio realizado por Han (2009). Estes autores descreveram o efeito terapêutico da rutina na artrite séptica, causada por *C. albicans*. Estudos anteriores realizados por Buzzini e colaboradores (2008) e Hong e colaboradores (2011), descreveram o ácido gálico, um tanino hidrolisável, como possuidor anticandida. Mesmo assim, o verdadeiro mecanismo de ação do ácido gálico em leveduras não tem sido amplamente estudado e elucidado. Hong e colaboradores (2011) postularam que a atividade antifúngica ocorre por este composto por perturbar a membrana celular e inibir o processo normal de brotamento, devido a destruição da sua integridade. Os resultados aqui obtidos mostraram a liberação de DNA no meio extracelular semelhante ao controle positivo (isoconazol) é mais atenuada ainda que ocorra. No entanto, uma concentração mais elevada de ROS foi observada em todos os tratamentos com os extratos de tucumã quando comparado ao grupo controle negativo. Portanto, estes resultados sugerem que o efeito do tucumã que leva ao estresse oxidativo também envolve o desequilíbrio REDOX.

O conjunto destes resultados sugerem que os extratos de tucumã possuem uma atividade antimicrobiana contra três bactérias Gram-positivas e atividade antifúngica contra *C. albicans*. Como esses microrganismos apresentam grande facilidade na produção de estirpes resistentes, estes efeitos são considerados relevantes. O mecanismo de ação antimicrobiano do tucumã parece envolver desequilíbrio REDOX que interrompe o crescimento dos microrganismos e/ou provoca um aumento da mortalidade. No entanto, este efeito apresenta alguma especificidade para cada microrganismo como pode ser observado através do papel dos diferentes compostos químicos encontrados nos extratos de tucumã no efeito antimicrobiano específico.

## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo que buscou analisar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcólico da polpa e da casca do *Astrocaryum aculeatum* (tucumã) e a potencial modulação do metabolismo oxidativo como mecanismo causal observou:

A ação antimicrobiana nos extratos para quatro microrganismos das trinta e sete estirpes microbianas testadas: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*.

A CIM foi diferente para cada um dos microrganismos previamente “suscetíveis” bem como a cinética de crescimento.

Os extratos do tucumã apresentaram ação antibiofilme para *C. albicans*.

Ação antimicrobiana foi dependente de alguns compostos polifenólicos isolados ou combinados presentes nos extratos de polpa e casca de tucumã. Entretanto, a ação antimicrobiana destes compostos foi diferente para cada um dos microrganismos, mostrando que o tucumã não possui um único agente indutor antimicrobiano que atua simultaneamente nestes microrganismos.

O mecanismo de ação antimicrobiana dos extratos do tucumã inclui desequilíbrio do estado REDOX e genotoxicidade nos microrganismos testados. Entretanto, estes processos guardam também especificidades relacionadas com cada um dos microrganismos suscetíveis.

## REFERÊNCIAS

- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vas Br**, 2004.
- APETREI C. L. et al. Chemical, antioxidant and antimicrobial investigations of L. bark and needles. **Molecules**; 16(9):7773-88, 2011.
- ASSOB, J. C. N. et al. Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Cameroon, 2011.
- BARREIRO, E. J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, 2001.
- BAUREDER M., REIMANN R., HEDERSTEDT L. Contribution of catalase to hydrogen peroxide resistance in *Enterococcus faecalis*. **FEMS Microbiol Lett**;331(2):160-4, 2012.
- BUZZINI P. et al. Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. **Rev Med Chem** 8(12):1179-87, 2008.
- CORRALES M. et al. Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. **Food Chem Toxicol** 2010;48(12):3471-6. doi: 10.1016/j.fct.2010.09.025. Epub 2010.
- CRUZ- SILVA, C. T. A.; PELINSON, A. P.; CAMPELO, A. M. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na região urbana no município de Quedas do Iguaçu – Paraná. Cascavel, 2009.
- CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents** 26: 343-356, 2005.
- DAGLIA M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Curr Opin Biotechnol** 23(2):174-81, 2012.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. São Paulo, 2007.
- DUBBS, J. M.; MONGKOLSUK, S. Peroxide-Sensing Transcriptional Regulators in Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, 2012.
- FELIPIN, S.; FRIZZO, M. N. Importância de alimentos funcionais na prevenção do estresse oxidativo e doenças. **Infarma, Brasília : Conselho Federal de Farmácia**, v. 22, 2010.
- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, 2006.



FILHO, C. C. et al. Um estudo sobre os impactos dos biofilmes microbianos nas indústrias. São Paulo, 2010.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. 2010.

GARCIA, L. F. M. et al. CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DA POLPA E DA CASCA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*). 2012. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, 2012.

HAN Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **Int Immunopharmacol** 2009; 9(2):207-11. doi: 10.1016/j.intimp.2008.11.002. Epub 2008.

HONG L. S. et al. Journal Gallic acid: An anticandidal compound in hydrolysable tannin extracted from the barks of *Rhizophora apiculata* Blume. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**; 01(06): 75-79, 2011.

HUYCKE M. M., GILMORE M. S. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. In: Horaud T, Bouvet A, Leclercq R et al. (eds) XIII Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Paris, France: **Plenum Press Div Plenum Publishing Corp**; 781–784, 1996.

JEONG K. W. et al Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. **J Nat Prod** 72(4):719-24, 2009.

JETT B. D., HUYCKE M. M., GILMORE M. S. Virulence of Enterococci. **Clin Microbiol Rev**; 7: 462–467, 1994.

KESSLER M., UBEAUD G., JUNG L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **J Pharm Pharmacol**; 55(1):131-42, 2003.

KREWER, C. C. et al. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. Santa Maria, 2011.

KUMARASAMY Y. et al. The assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota* L) seeds. **J Herb Pharmacother** 5(1):61-72, 2005.

LANDETE J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism and health. **Crit Rev Food Sci Nutr**; 52(10): 936- 48, 2012.

LENNARTSON, A. et al. All-trans retinoic acid-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human myeloid cells correlates to binding of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  to the BPI promoter. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, 2006.

LOPES, A. A. et al. Aumento da frequência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. Salvador, 1998.

LOTAN, R. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 605, n. 1, p. 33-91, 1980.

MAEDA, Y. et al. Biomechanical analysis on platform switching: is there any biomechanical rationale? *Clin Oral Impl Res*, v.18, p.581-584, 2007.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS microbiology*, 2001.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525:145–160, 2012.

MOLS M., ABEE T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 13(6), 1387–1394, 2011.

MUELLER U. et al. Identification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a major antimicrobial component in coffee. *Food Funct*; 2(5):265-72, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, Antimicrobial resistance. N. 194, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em: 30 out 2012.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, 2008.

PANGHAL, M. et al. In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, Haryana, India, 2011.

PERIAGO, M. R. Antimicrobial resistance: a risk factor for infectious diseases. *Rev Panam Salud Publica*, 2011.

POLITI, F. A. S. et al. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. *International Journal of Molecular Sciences*, São Paulo, 2011.

QUIDEAU S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Chem Int*; 50: 586-621, 2011.

RAJAEI A. et al. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(1):107-12. Doi: 10.1016/j.fct.2009.09.023. Epub 2009.

RAMAGE, G. et al. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*, Glasgow, 2011.

RAMASWAMY V. et al. "Listeria – review of epidemiology and pathogenesis." **J Microbiol Immunol Infect**; 40 (1):4–13, 2007.

ROBINSON J. P. et al. Measurement of intracellular fluorescence of human monocytes relative to oxidative metabolism. **J Leukoc Biol**; 43(4):304-10, 1988.

ROGERS, S. A. et al. Synthesis and biological evaluation of 2-aminoimidazole/carbamate hybrid anti-biofilm and anti-microbial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. United States, 2010.

SAEI-DEHKORDI S. S., FALLAH A. A., KOUSHA S. Chemical composition and antioxidative activity of *Echinophora platyloba* DC. essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food-borne pathogens and spoilage organisms. **J Food Sci** 2012; 77(11):M631-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02956.x. Epub 2012.

STENFORS A. L. P., FAGERLUND A., GRANUM P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiol Rev**; 32:579-606, 2008.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica. 2005.

SMITH et al. *Retinoids in cancer therapy*. **JCO**. 1992; 10: 839-864.

SZEMES T. et al. On the origin of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms in *Enterococcus faecalis*. **Redox Report** V15, N5. doi: 10.1179/135100010X12826446921581, 2010.

TOYOKUNI, S. et al. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, v. 358, 1995.

TRAVASSOS, I. O.; MIRANDA, K. C. V. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Infarma**, v.22, 2010.

WANG X. M., HUYCKE M. M. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. **Gastroenterology**; 132:551-561, 2007.

WANG Y. et al. Two distinct manganese-containing superoxide dismutase genes in *Bacillus cereus*: their physiological characterizations and roles in surviving in wheat rhizosphere. **FEMS Microbiol Lett**; 272(2):206-13, 2007.

YANG, S. et al. Estratégias de Inovação no Processo de Desenvolvimento de Produto: Um Estudo de Caso com Indústrias Farmacêuticas. Porto Alegre, 2011.

YUYAMA, L. K. O. et al. Polpa e casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer): quais os constituintes nutricionais? In: **Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 8. Nutrire: Revista Sociedade Brasileira Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 30, Suplemento, p. 225, 2005.