



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**PLANTAS MEDICINAIS DA GUINÉ-BISSAU: ESTUDO DA SUA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**

**LILIANA CATARINA NUNES E SILVA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Janeiro, 2014**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**PLANTAS MEDICINAIS DA GUINÉ-BISSAU: ESTUDO DA SUA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**

**Autor:** Liliana Catarina Nunes e Silva

**Orientadora:** Professora Doutora Olga Matos

**Co-orientador:** Investigador Auxiliar Fernando Cardoso

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biomédicas



Agradeço ao Doutor Luís Catarino (JBT-IICT/CIBIO) e Professor Bucar Indjai (INEP - Guiné-Bissau), as plantas utilizadas, sem as quais seria impossível realizar este trabalho.

Os meus agradecimentos ao Programa de Reagentes NIH AIDS, Divisão de AIDS, NIAID, NIH, através do qual obtive as células HeLa, cedidas pelo Dr. Richard Axel e as células 3T3, cedidas pelo Dr. Thomas D. Martin e do Dr. Vineet N. KewalRamani. Também o meu agradecimento ao Dr. David Roos, por ter cedido *Toxoplasma gondii* estirpe RH, através do Programa de Reagentes NIH AIDS, Divisão de AIDS, NIAID, NIH.

Um especial agradecimento ao Investigador Auxiliar Fernando Cardoso por toda a ajuda e paciência ao longo deste ano.

Mas, os meus maiores agradecimentos vão para os meus pais, porque é a eles que devo tudo, mas também à Marta, pela imensa ajuda dada e pela amizade inigualável. Obrigado por estarem comigo desde sempre e para sempre.

As plantas têm sido utilizadas há vários milénios como fármacos. Atualmente, a pesquisa de fármacos a partir de plantas medicinais envolve uma abordagem multifacetada, que combina técnicas botânicas, fitoquímicas, biológicas e moleculares, tendo em vista o desenvolvimento de novos fármacos contra doenças neoplásicas, doenças infecciosas e parasitárias.

Neste projeto foram testadas 21 plantas oriundas da Guiné-Bissau, com o objetivo de identificar atividade antibacteriana, antiparasitária e quimiopreventiva. Foram utilizados três solventes de extração para as 21 amostras de plantas: o metanol, o clorofórmio e o etil acetato. Os extratos de plantas foram testados para os microrganismos *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Toxoplasma gondii*, de forma a determinar a existência de atividade antibacteriana e antiparasitária. Os extratos também foram testados sobre células Vero, 3T3, HeLa e Hep2, de modo a determinar a sua atividade citotóxica. A capacidade antioxidante e conteúdo em polifenóis dos extratos também foram estudados.

Os resultados obtidos demonstraram que algumas plantas possuem atividade antibacteriana contra os microrganismos estudados, nomeadamente os extratos de *Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum* e *Ocimum basilicum*. Os extratos de *Ocimum gratissimum* e *Combretum micratum* demonstraram atividade anti-*T. gondii*. Foram obtidos bons resultados quanto à atividade antioxidante destas plantas, mas estas mostraram-se relativamente tóxicas, para as concentrações estudadas, quando em contato com as células animais estudadas. Estes resultados evidenciam que as *Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum* apresentam potencial quanto ao desenvolvimento de fármacos, a partir dos seus extratos, com propriedades antibacteriana e antiparasitárias.

For thousands of years plants have been used as medicines. Nowadays, the research of drugs from medicinal plants involves a multifaceted approach combining botanical, phytochemical, biological, and molecular techniques, considering the development of new drugs against diseases, such as cancer and infectious and parasitic diseases.

In this study, 21 plants from Guiné-Bissau, were tested with the aim of identifying possible actions of the plant extracts as antibacterial, antiparasitic and chemopreventive agents. In this work, methanol, chloroform and ethyl acetate were used as extraction solvents on these 21 samples. These extracts were tested against microorganisms such as *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Toxoplasma gondii*, in order to prove the existence of antibacterial and antiparasitic activity of these plants. Vero, 3T3, HeLa and Hep2 cells were placed in contact with the studied plant extracts, to understand its action on these cell lines. The antioxidant capacity of these plants was also measured, in order to determine their chemopreventive activity.

The results showed that *Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum* and *Ocimum basilicum* possess antibacterial activity against the studied microorganisms. *Ocimum gratissimum* and *Combretum micratum* also showed activity against *Toxoplasma gondii*. Antioxidant activity was observed in some of the plants' extracts studied, but these extracts were very toxic when in contact with the studied animal cells. These results demonstrate that *Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* are promising for the development of drugs from their extracts, with antibacterial and antiparasitic properties.

Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	v
<i>Abstract</i> .....	vi
Índice .....	vii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas .....	xii
Índice de Gráficos .....	xiii
Lista de Abreviaturas .....	xv
Capítulo I - Introdução.....	17
1.1 As plantas medicinais ao longo da história .....	18
1.2 O uso de plantas medicinais em África, nomeadamente na Guiné Bissau .....	20
1.3 Estudo das plantas medicinais e a descobertas de fármacos .....	22
1.4 Metabolitos secundários e o seu papel .....	26
1.4.1 Terpenos .....	27
1.4.1.1 Monoterpenos .....	28
1.4.1.2 Sesquiterpenos .....	28
1.4.1.3 Diterpenos.....	28
1.4.1.4 Triterpenos.....	29
1.4.2 Fenóis .....	30
1.4.2.1 Flavonóides.....	30
1.4.3 Alcalóides .....	30
1.5 Métodos utilizados na caracterização das plantas .....	31
1.5.1 Extração de compostos bioativos .....	31
1.5.2 Caracterização dos extratos vegetais .....	33
1.5.2.1 Metodologias Fitoquímicas .....	34
1.5.2.2 Metodologias Químicas .....	35
1.5.2.3 Metodologias Biológicas .....	38
1.5.2.3.1 <i>Artemia salina</i> .....	38
1.5.2.3.2 Bactérias .....	39
1.5.2.3.3 Células Animais.....	39
Capítulo II - Objetivos .....	47
Capítulo III - Material e Métodos .....	49
3.1 Obtenção e produção da biblioteca de compostos .....	50

3.2 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em bactérias.....	52
3.2.1 Avaliação qualitativa da atividade bacteriana .....	52
3.2.1.1 Em meio sólido.....	52
3.2.1.2 Em meio líquido .....	53
3.2.2 Avaliação quantitativa da atividade bacteriana em meio líquido.....	54
3.3 Avaliação fitoquímica dos extratos vegetais.....	55
3.4 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em células animais .....	56
3.5 Avaliação dos extratos vegetais em <i>Artemia salina</i> .....	57
3.6 Avaliação dos extratos vegetais em <i>Toxoplasma gondii</i> .....	58
3.7 Avaliação dos extratos vegetais quanto à sua composição em polifenóis .....	58
3.8 Avaliação dos extratos vegetais quanto à atividade do óxido nítrico .....	60
3.9 Avaliação dos extratos vegetais quanto à atividade antioxidante (ABTS) .....	60
3.10 Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos vegetais na reparação de ADN.....	61
Capítulo IV - Resultados.....	65
4.1 Obtenção da biblioteca de extratos .....	66
4.2 Análise dos ensaios qualitativos dos extratos vegetais em bactérias .....	68
4.3 Determinação da CMI para <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. faecalis</i> .....	72
4.4 Resultados obtidos por TLC.....	73
4.4.1 Observação macroscópica dos resultados para os extratos totais e frações de extratos por metanol .....	73
4.4.2 Observação através de UV dos resultados para os extratos totais e frações de extratos por metanol .....	74
4.4.3 Testes químicos realizados para os extratos totais .....	76
4.4.4 Inibição bacteriana nas placas de TLC dos extratos totais.....	77
4.5 Atividade dos extratos vegetais em células animais .....	79
4.6 Análise da atividade dos extratos vegetais em <i>Artemia salina</i> .....	80
4.7 Ação dos extratos vegetais em <i>Toxoplasma gondii</i> .....	82
4.8 Análise da composição em polifenóis dos extratos vegetais .....	84
4.9 Análise da redução da atividade do óxido nítrico nos extratos vegetais.....	85
4.10 Análise da atividade antioxidante dos extratos vegetais (ABTS) .....	86
4.11 Reparação de ADN .....	87
Capítulo V – Discussão.....	92
5.1 Determinação da suscetibilidade bacteriana aos extratos em meio sólido e líquido .....	93
5.1.1 Em meio sólido.....	93
5.1.2 Em meio líquido .....	95

5.2 Aplicação da técnica de TLC .....	96
5.2.1 Extratos totais e frações de extratos por metanol, macroscopicamente e através de UV .....	96
5.2.3 Testes químicos .....	96
5.2.4 Bioatividade dos extratos totais.....	97
5.3 Células Animais – ensaios de citotoxicidade .....	98
5.4 LC <sub>50</sub> para Artemia salina.....	99
5.5 Toxoplasma gondii.....	99
5.6 Composição dos extratos vegetais testados em polifenóis, óxido nítrico e antioxidantes .....	100
5.7 Análise da reparação do ADN.....	102
Capítulo VI - Conclusões.....	104
Referências Bibliográficas .....	107
Anexos .....	117
Anexo A .....	118
Anexo B .....	120
Anexo C .....	125
Anexo D .....	127
Anexo E.....	128
Anexo F.....	129
Anexo G .....	130

## Índice de Figuras

Figura 1 – Algumas das plantas que os Guineenses utilizam na medicina tradicional ..	22
Figura 2 – Etapas para o desenvolvimento de um novo fármaco .....	25
Figura 3 – Abordagens correntes para a descobertas de fármacos a partir de plantas medicinais .....	26
Figura 4 – Unidade de Isopreno.....	27
Figura 5 - $\alpha$ - santonina. ....	28
Figura 6 – Estrutura de ginkgolídeo, exemplo de diterpeno presente na Ginkgo Biloba. ....	29
Figura 7 – Estrutura do ginsenosídeo, exemplo de triterpeno presente no Ginseng.....	29
Figura 8 – Estrutura de isoflavanóide, exemplo de um flavonóide. ....	30
Figura 9 – Estrutura da cafeína, exemplo de um pseudo-alcalóide. ....	31
Figura 10 – Biblioteca dos extratos .....	51
Figura 11- Demonstração da aplicação das amostras na microplaca.....	55
Figura 12 – <i>Artemia salina</i> em poço de fundo plano.....	57
Figura 13 – Processo de extração com os solventes escolhidos .....	66
Figura 14 - Produtos das extrações obtidos após sucessivas lavagens em resina Diaion HP-20 (Supelco).. ....	67
Figura 15 - Halos de inibição da placa inoculada com <i>E. faecalis</i> . Os extratos testados tinham sido extraídos com metanol. ....	68
Figura 16 - Halos de inibição da placa inoculada com <i>S. aureus</i> . Os extratos testados tinham sido extraídos com clorofórmio. ....	68
Figura 17 - Halos de inibição da placa inoculada com <i>S. aureus</i> . Os extratos testados tinham sido extraídos com etil acetato.....	69
Figura 18- Resultados obtidos pela técnica de TLC para os extrato totais 5, 6, 7, 8, 16 e 35.. ....	73
Figura 19 - Resultados obtidos pela técnica de TLC para as frações das amostras selecionadas. ....	74
Figura 20 – Resultados da exposição a luz UV dos extratos vegetais testados por TLC. ....	75
Figura 21 - Resultados da técnica de TLC das frações de extratos que mais haviam demonstrado atividade antibacteriana, obtidos por exposição a luz UV. ....	75
Figura 22 - Resultados após pulverização com reagente de Folin-Ciocalteu para reação com fenóis.....	76
Figura 23- Resultados após pulverização com reagente 4-(Dimetilamino)benzaldeído para reação com terpenos.....	76
Figura 24 - Resultados após pulverização com reagente Dragendorff-Munier para reação com alcaloides. ....	77
Figura 25 – Coloração adquirida pelas placas semeadas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> após realização da técnica do MTT. ....	78

Figura 26 - Coloração adquirida pelas placas semeadas com <i>Staphylococcus aureus</i> após realização da técnica do MTT.....	78
Figura 27 - Gel obtido após corrida das recções testadas para obtenção do reagente de Fenton da reacção final. ....	87
Figura 28 - Segundo gel obtido após corrida das recções testadas para obtenção da concentração ideal de ácido ascórbico para a reacção final. ....	88
Figura 29 - Gel obtido após corrida das recções testadas para obtenção da concentração ideal de morina e ácido cafeico a utilizar para a reacção final. ....	89
Figura 30 - Gel obtido após corrida da reacção final para todas as amostras extraídas com, onde se testou a capacidade de cada extrato em regenerar o ADN do plasmídeo... ..	90
Figura 31 - Comportamento dos controlo utilizados na reacção final.....	90

## Índice de Tabelas

Tabela I - Diferentes linhas celulares. ....	41
Tabela II - Plantas testadas e número de amostra correspondente .....	50
Tabela III – Soluções utilizadas para traçar reta de calibração, para determinação de compostos fenólicos.....	59
Tabela IV - Soluções testadas para obtenção do reagente de Fenton ideal .....	62
Tabela V – Diluições utilizadas para determinação da concentração de ácido ascórbico .....	63
Tabela VI – Controlos utilizados para determinação da concentração de ácido ascórbico .....	63
Tabela VII - Concentrações necessárias de extrato para obter 50% de mortalidade (LC50) da <i>Artemia salina</i> .....	81
Tabela VIII – Presença ou ausência de atividade reparadora de cada extrato, para o ADN.....	91

## Índice de Gráficos

Gráfico 1- Diâmetro dos halos obtidos para <i>Ficus polita</i> (Amostra 1).....	68
Gráfico 2 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Trichilia prieuriana prieiruaana</i> (Amostra 5).....	68
Gráfico 1 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Margaritaria discoidea</i> (Amostra 6).....	68
Gráfico 4 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Psychotrya peduncularis</i> (Amostra 7).....	68
Gráfico 5 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Combretum micrantum</i> (Amostra 8).....	68
Gráfico 6 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Zanthoxylum leprieuri</i> (Amostra 9).....	68
Gráfico 7 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Cassytha filiformis</i> (Amostra 10).....	68
Gráfico 8 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Cisampelos mucronata</i> (Amostra 11).....	68
Gráfico 9 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Capparis erythrocarpus</i> (Amostra 12).....	68
Gráfico 10 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Strophantus sarmentosus</i> (Amostra 13).....	68
Gráfico 11 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Ocimum gratissimum</i> (Amostra 15).....	69
Gráfico 12 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Ocimum basilicum</i> (Amostra 16).....	69
Gráfico 13 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Abrus precatorius</i> (Amostra 17).....	69
Gráfico 14 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Khaya senegalensis</i> (Amostra 22).....	69
Gráfico 15 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Faidherbia albida</i> (Amostra 23).....	69
Gráfico 16 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Cnestis ferruginea</i> (Amostra 24).....	69
Gráfico 17 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Landolphia dulcis</i> (Amostra 25).....	69
Gráfico 18 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Allophylus africanus</i> (Amostra 26).....	69
Gráfico 19 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Hymenocardia acida</i> (Amostra 27).....	70
Gráfico 20 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Leptadenia hastata</i> (Amostra 34).....	70
Gráfico 21 - Diâmetro dos halos obtidos para <i>Calypetrochilum christyanum</i> (Amostra 35).....	70
Gráfico 22 - Valores de DO obtidos após técnica MTT. ....	78
Gráfico 23 - Percentagens de células viáveis após exposição aos extratos testados $\pm$ SD.....	79
Gráfico 24 - LC50 para a amostra 25, extraída com clorofórmio.....	81

Gráfico 25 - Percentagem de células viáveis infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> , após exposição às amostras extraídas com metanol.....	82
Gráfico 26 - Percentagem de células viáveis infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> , após exposição às amostras extraídas com etil acetato.....	82
Gráfico 27 - Percentagem de células viáveis infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> , após exposição às amostras extraídas com clorofórmio.....	83
Gráfico 28 - Concentrações em mg/g equivalentes ao propile galato dos extratos vegetais após diluição 1/50.....	84
Gráfico 29 - Percentagem da atividade de redução do óxido nítrico para cada amostra testada .....	85
Gráfico 30 - Percentagens de atividade de redução das amostras com poder antioxidante.....	86

a.C. – Antes de Cristo

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

acetil-CoA – Acetil – Coenzima A

ADME - Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CMI - Concentração Mínima Inibitória

d. C. – Depois de Cristo

DMAPP - Difosfato de dimetilalilo

DME - Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles*

DMSO - *dimetil sulfóxido*

DO - Densidade ótica

Fe<sup>2+</sup> - Ião ferroso

FW - Fração Water

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogénio

HIV-1 - Vírus da Imunodeficiência Adquirida 1

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

INT - Reagente violeta de p-iodonitrotetrazólio

IPP - Pirofosfato de isopentenila

LC50 - Dose letal mediana

Meio LB - Meio de cultura Luris-Bertani

MTT - Tetrazólio amarelo, (3- [4,5-dimetiltiazol-2yl] -2,5-difenil brometo de tetrazolina)

OMS - Organização Mundial de Saúde

ON - Óxido nítrico

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia

PMS - Metossulfato de Fenazina

RNAase - Ribonuclease

rpm - Rotações por minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Nitroprussiato de sódio

TLC - Cromatografia em Camada Fina

TSB - Meio de cultura Trypticase Soy Broth

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

UV - Ultravioleta

XTT - Sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

## **Capítulo I - Introdução**

## 1.1 As plantas medicinais ao longo da história

O homem tem aproveitado as propriedades da natureza a seu favor; o uso das plantas é a base de um sistema sofisticado de medicina e a sua utilização como meio curativo é tão antigo como o próprio homem (Morales, 1996; Cragg e Newman 2005). Aos poucos, e através dos tempos, o ser humano aprendeu a reconhecer e a usar as plantas como fármacos, maioritariamente através de tentativa erro.

Os primeiros testemunhos arqueológicos da utilização das plantas medicinais remontam ao período Neandertal, à cerca de 60 000 anos, na região do Iraque (MacDonald, 1995; Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2013). Estes povos colocavam junto aos seus mortos, plantas como milefólio (*Achillea*), cardo (*Centaurea*) ou arbusto (*Ephedra*), apesar de não ser completamente claro se o faziam pela prática de um gesto de bondade ou se tinham um intuito medicinal (MacDonald, 1995). Quando a alfabetização dos povos se tornou o meio básico de comunicação humana, foi possível estabelecer e sistematizar o conhecimento botânico para fins medicinais. Foram encontradas tábuas de argila Sumérias, as quais datam de cerca de 5 000 anos antes de Cristo (a.C.), um livro de origem Chinesa (2 500 a.C.) e papiros Egípcios (2 000 a.C.) que descrevem prescrições e ensinam a arte e a técnica de preparar medicamentos (farmacopéias), sendo que muitas dessas plantas são, hoje em dia, conhecidas pelos seus constituintes bioativos (MacDonald, 1995; Gurib-Fakim, 2005; Petrovska, 2012). Alguns desses exemplos são a mamona, a babosa, a cebola, o salgueiro, o coentro, a cânfora, o *ginseng*, a casca de canela, a efedrina e o zimbro.

Mais tarde, os gregos salientaram-se na aplicação sistemática de métodos científicos na medicina tradicional. Hipócrates, conhecido como o pai da medicina, sujeitou os remédios tradicionais ao discurso crítico e, através dos seus livros, sabemos que a medicina era baseada na regulação de uma dieta, auxiliada com o uso de comprimidos, poções, pomadas e inalações de numerosas plantas nativas e estrangeiras (MacDonald, 1995; Gurib-Fakim, 2005; Petrovska, 2012). Dioscórides, cerca de 100 anos depois de Cristo (d.C.), através das suas viagens pela Europa e Ásia, enquanto cirurgião do exército Romano de Nero, escreveu *De Materia Medica*, onde descreveu o uso de mais de 500 espécies de plantas na sua prática medicinal, a história natural das que eram usadas nas drogas, bem como a descrição de preparação destas (Gurib-Fakim,

2005). Dioscórides especificou também as partes das plantas que contêm as propriedades ativas (MacDonald, 1995; Petrovska, 2012). Das plantas mais utilizadas por si, encontravam-se a camomila (*Matricaria recucita* L.) usada como anti-inflamatório, a mandrágora (*Atropa mandragora*) utilizada como óleo sedativo e a mamona (*Ricinus communis*) usada como purgante.

Por mais de mil anos, *De Materia Medica* foi a base do conhecimento sobre as plantas medicinais, até ao período Renascentista (MacDonald, 1995). Contudo com o período dos Descobrimentos muitas plantas foram trazidas para a Europa, vindas da Ásia, África e América. Assim o conhecimento sobre as plantas foi-se aprofundando. Contudo, a Europa Cristã, apesar de fazer notáveis avanços neste campo, também sofreu algum atraso, pois a população alfabetizada, representada pelos monges, vivia maioritariamente em claustros, estando impedidos de questionar crenças e conhecimentos antigos (MacDonald, 1995; Petrovska, 2012). Só no final do século XV é que, aproveitando as potencialidades do Novo Mundo e das trocas marítimas, foram conduzidas pesquisas para as novas plantas medicinais, mas até meados do século XIX, as plantas continuaram a constituir a maioria dos agentes terapêuticos (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Cragg e Newman, 2005; Adams *et al.*, 2009).

Durante o século XIX, houve a modernização dos métodos químicos, levando á descoberta de outras substâncias ativas das plantas medicinais, como taninos (polifenóis de origem vegetal), óleos etéreos, vitaminas e hormonas. Ao longo desse século e do século XX foram feitos diversos estudos sobre a eficácia das plantas medicinais e, aos poucos foi-se tendo acesso, através de remoção por procedimentos químicos, aos compostos ativos das plantas, como alcalóides e glicosídeos. Contudo, percebeu-se que os extratos puros, apesar de atuarem mais rapidamente, não tinham um efeito tão longo nem tão completo, como o das plantas, pelo que se propuseram métodos de estabilização das plantas medicinais frescas, especialmente para aquelas com componentes medicinais instáveis (MacDonald, 1995; Petrovska, 2012). Assim, este sistema de medicina continua nos dias de hoje a ter um importante papel nos cuidados de saúde humanos, tendo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimado que aproximadamente 80% da população mundial continua a confiar maioritariamente na medicina tradicional, para os seus cuidados primários de saúde (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Cragg e Newman, 2005).

## 1.2 O uso de plantas medicinais em África, nomeadamente na Guiné Bissau

África é um dos locais onde mais se utiliza a medicina tradicional. A grande biodiversidade que existe nas florestas tropicais, nas savanas e nos seus ambientes únicos deu às culturas indígenas uma grande variedade de plantas, tendo como consequência um conhecimento riquíssimo sobre o uso das plantas para fins medicinais (Simon *et al.*, 2007). Apesar dessa riqueza, e ao contrário dos outros continentes, este não contribui muito para o comércio global dos produtos naturais, devido principalmente à falta de qualidade dos produtos vendidos pelos negociantes, dos limitados apoios à investigação e da desvalorização do valor da matéria-prima na região. Como exemplos de algumas plantas africanas temos o *Aloe vera*, unha do diabo (*Harpagophytum procumbens*), rooibos (*Aspalathus linearis*), malagueta (*Aframomum melegueta*), gengibre africano (*Mondia whitei*) e cânfora (*Cinnamomum camphora*) (Simon *et al.*, 2007; Abdullahi, 2011).

A medicina em África tem ainda muito o cunho dos curandeiros tradicionais, que aplicam tratamentos ao doente de forma holística, tentando primeiro juntar o equilíbrio social e emocional com base em regras e relações com a comunidade e só depois tratar os sintomas, sempre com o auxílio das plantas medicinais, que são prescritas para esses fins (Gurib-Fakim, 2005; Abdullahi, 2011). Em geral a aquisição do conhecimento do uso de plantas medicinais faz-se através da transmissão por relações familiares (Indjai *et al.*, 2010). Na Guiné Bissau não é exceção. Sendo um dos países africanos mais pobres da África, tem uma cultura na medicina tradicional muito vasta e enraizada, desempenhando o curandeiro o papel de especialista em plantas medicinais. A medicina oficial é pouco acessível e não possui os meios para tratar convenientemente os habitantes deste país. Contudo há colaborações entre os agentes da medicina tradicional e da medicina oficial e mesmo de padres e freiras católicos que tentam recolher, transcrever e adaptar as receitas tradicionais (Indjai *et al.*, 2010). Apesar de quase toda a população conhecer uma ou mais plantas com utilização medicinal, são poucos os verdadeiros curandeiros que detêm conhecimentos mais profundos sobre estas plantas. Também aqui, os conhecimentos sobre as plantas

medicinais são obtidos por transmissão familiar, apesar de poder ser feito através de pagamento, na compra de determinada receita, junto ao curandeiro.

Um determinado número de plantas têm revelado, quando sujeitas a análises laboratoriais, possuir produtos naturais com propriedades curativas, tendo sido comprovada a sua atividade antibiótica e antifúngica. No entanto, também foi detetada elevada toxicidade de outras plantas, quando aplicadas em doses excessivas (Diniz e Martins, 2005).

Entre as principais enfermidades tratadas pela medicina tradicional na Guiné-Bissau estão as dores de cabeça, dores corporais, dores de dentes, infertilidade feminina, parto (há plantas para o facilitar), falta de leite para amamentação, diarreia, obstipação, inflamações, infeções, queimaduras, malária, febre, tosse, gripe, picadas, mordeduras, envenenamentos, hipertensão e impotência sexual masculina (Indjai *et al.*, 2010). De entre a variedade de plantas que os Guineenses utilizam para a sua medicina tradicional, destacam-se o *Abrus precatorius* subsp. *africanus*, *Allophylus africanus*, *Anacardium occidentale*, *Calyptrichilum christyanum*, *Capparis erythrocarpus*, *Cassytha filiformis*, *Cisampelos mucronata*, *Cnestis ferruginea*, *Ficus polita*, *Hymenocardia acida* e *Psychotria peduncularis*, entre outras (Indjai *et al.*, 2010). Alguns exemplos encontram-se na figura 1.

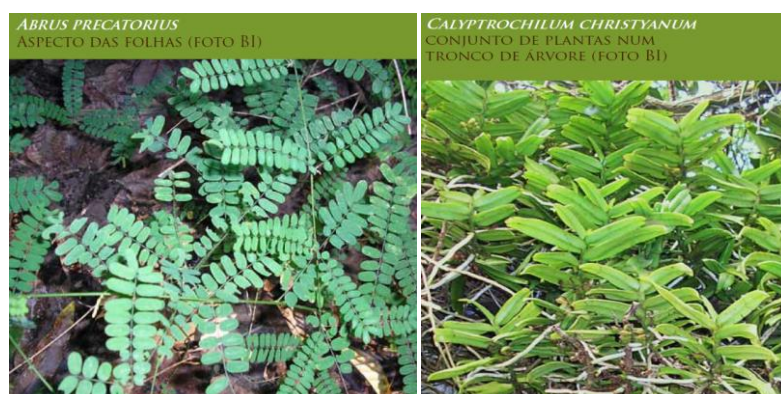




Figura 1 – Algumas das plantas que os Guineenses utilizam na medicina tradicional (adaptado de Indjai *et al.*, 2010).

### 1.3 Estudo das plantas medicinais e a descobertas de fármacos

A descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais evoluiu por incluir vários campos de investigação e vários métodos de análise. Os objetivos primários da etnobotânica moderna não são o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, nem a descoberta de novas entidades químicas bioativas, mas sim elucidar as atividades farmacológicas de uma determinada planta (Balunas e Kinghorn, 2005; MacClatchey *et al.*, 2009). O termo etnobotânica surgiu em 1895, quando o botânico norte-americano John Harshberger descreveu estudos de “plantas usadas pelos povos primitivos e aborígenes” e rapidamente se desenvolveu como uma ciência, dando novas ferramentas para a pesquisa farmacêutica, quer para a OMS quer para companhias farmacêuticas, tendo estas começado a investir em expedições de etnobotânica a regiões tropicais (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Gurib-Fakim, 2005). Na história mais recente, a utilização de plantas como fármacos tem envolvido o isolamento de compostos ativos, como por exemplo o isolamento de morfina a partir do ópio, no início do século XIX (Balunas e Kinghorn, 2005). A descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais levou ao isolamento de compostos, como a cocaína, codeína, digitoxina, e quinina. Atualmente, mais de 100 compostos naturais estão atualmente a passar por testes clínicos e outros tantos estão em desenvolvimento pré-clínico (Mukherjee *et al.*, 2010). A maioria dos medicamentos projetados atualmente é derivado de plantas ou fontes microbianas (como fungos, algas e bactérias), mas também se sabe que apenas uma pequena parte da biodiversidade das plantas do mundo tem sido testada para efeitos de

bioatividade (Mukherjee *et al.*, 2010). Casos como o da aceitação da quinina como tratamento da malária no século XVII e a descoberta da morfina, fizeram com que o público em geral acreditasse nas maravilhas da riqueza dos produtos naturais para o tratamento farmacológico de vários distúrbios.

O termo farmacognosia tem origem no grego e traduz-se em “adquirir conhecimentos dos fármacos”. Foi introduzido por Seidler em 1815 e traduz-se no estudo de substâncias com origem natural que possuem uma virtude medicinal, estando amplamente ligada à botânica (de onde provém a matéria prima) e à fitoquímica, que analisa os extratos e revela a composição química destes compostos naturais (Morales, 1996; Gurib-Fakim, 2005). Aliada à farmacognosia está sempre a farmacologia, que estuda o efeito dos fármacos num organismo, tendo em conta a dosagem, toxicidade e efeitos secundários (Morales, 1996). É esta ciência que faz a ponte com a fisiologia animal e a medicina. Como praticado hoje em dia, a farmacognosia envolve o estudo amplo de produtos naturais a partir de várias fontes, incluindo plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos (Gurib-Fakim, 2005).

O processo de desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais normalmente começa com um botânico, etnobotânico, etnofarmacologista ou ecologista de plantas, que recolhe e identifica as plantas de interesse (Mukherjee *et al.*, 2010). A colheita das plantas medicinais pode envolver espécies com atividade biológica conhecida, para as quais o composto ativo ainda não foi isolado (e.g., os remédios à base de plantas) ou pode envolver *taxa* recolhidos aleatoriamente por um programa de rastreio. É importante trabalhar em estreita colaboração com a população local que utilizam estas plantas e compreender o contexto cultural do uso das mesmas. Alguns indícios da bioatividade incluem efeitos colaterais, terapias adjuvantes e meios de dosagem, que são conhecidos pelos curandeiros competentes (Mukherjee *et al.*, 2010). O estudo fitoquímico do extrato preparado à base de plantas envolve o isolamento, a elucidação da estrutura/composição e avaliação da bioatividade (Pan *et al.*, 2013). Esses extratos são sujeitos a um rastreio em ensaios biológicos farmacologicamente relevantes, para iniciar o processo de isolamento e caracterização dos compostos ativos por meio de fracionamento biomonitorizado (Balunas e Kinghorn, 2005). A biologia molecular tornou-se essencial para a descoberta de fármacos a partir de plantas

medicinais, através da definição e execução de testes de rastreio adequados, voltados para alvos moleculares fisiologicamente relevantes (Balunas e Kinghorn, 2005).

O controlo de qualidade dos medicamentos tradicionais é uma questão crítica e essencial a ser considerado para assegurar a sua segurança e eficácia terapêutica, e para racionalizar o seu uso na área da saúde (Mukherjee *et al.*, 2010). A análise dos compostos é cada vez mais utilizada para a padronização de formulações medicinais tradicionais. As concentrações dos metabolitos secundários, os principais constituintes dos medicamentos naturais, são estudadas proporcionando procedimentos avaliados de normalização científicos. Esta técnica não só ajuda a estabelecer a identidade botânica correta, como também ajuda na regulação da pureza química das plantas. A maioria dos medicamentos à base de plantas pode ser considerada como tendo efeitos terapêuticos, mas podem não os ter na extensão e dosagem desejada, ou para o alvo desejado. A maioria tem baixa biodisponibilidade, devido a problemas de solubilidade, os quais causam a redução da absorção, metabolismo rápido e excreção (Mukherjee *et al.*, 2010).

Apesar de muitos dos medicamentos que existem atualmente no mercado derivarem de plantas, essa contribuição podia aumentar substancialmente, face ao número de plantas que continua por estudar. Embora muitas vezes os etnobotânicos recolham dados sobre toda a gama de usos culturais das plantas medicinais, nenhum laboratório tem a capacidade de testar todas as hipóteses possíveis sobre o uso de uma única espécie de plantas. Além disso, as análises não estão disponíveis para testar todos os tipos de atividade. Em vez disso, as plantas que são selecionadas são as que têm compostos ativos dentro do intervalo dos ensaios já em funcionamento nos laboratórios. Isto é claramente o principal fator limitante na capacidade do etnobotânico para fazer novas contribuições. Há uma grande acumulação de plantas com tradição de uso cultural interessante, mas no entanto, muito poucas são sujeitas a testes fitoquímicos (Mukherjee *et al.*, 2010). De facto, estima-se que apenas 1 em 5 000 compostos vai avançar com sucesso para ensaios clínicos e ver aprovada a sua utilização. Sendo a identificação o primeiro passo de um processo moroso, também o é a otimização (envolvendo a química medicinal e combinatória), o desenvolvimento (incluindo a farmacologia, toxicologia, farmacocinética, a absorção/ distribuição/ metabolismo/ excreção [ADME] e entrega da fármacos) e os ensaios clínicos, como se mostra na figura 2 e na figura 3 (Balunas e Kinghorn, 2005; Pan *et al.*, 2013).

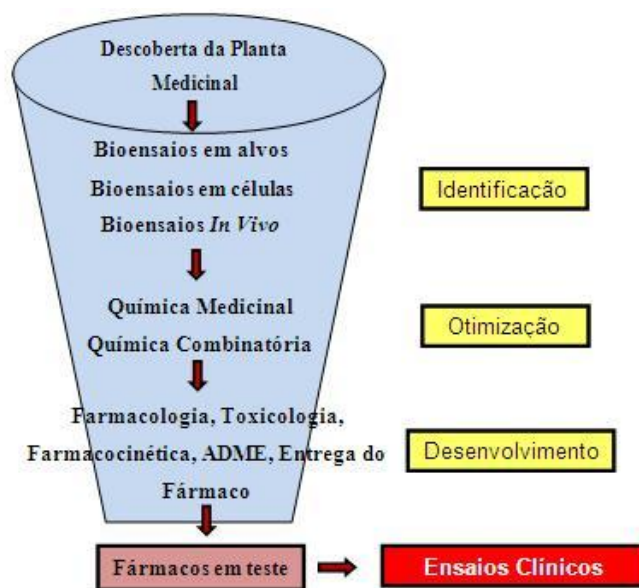


Figura 2 – Etapas para o desenvolvimento de um novo fármaco (Balunas e Kinghorn, 2005)

Atualmente, os produtos naturais e os seus derivados representam mais de 50% de todos os fármacos usados clinicamente no mundo (Gurib-Fakim, 2005; Pan *et al.*, 2013). Aproximadamente 80% dos medicamentos antimicrobianos, imunossuppressores, cardiovasculares e anticancerígenos são de origem vegetal, sendo também aceite que mais de 80% das substâncias medicamentosas ou são diretamente derivadas de produtos naturais, ou são desenvolvidas a partir de um composto natural (Pan *et al.*, 2013).

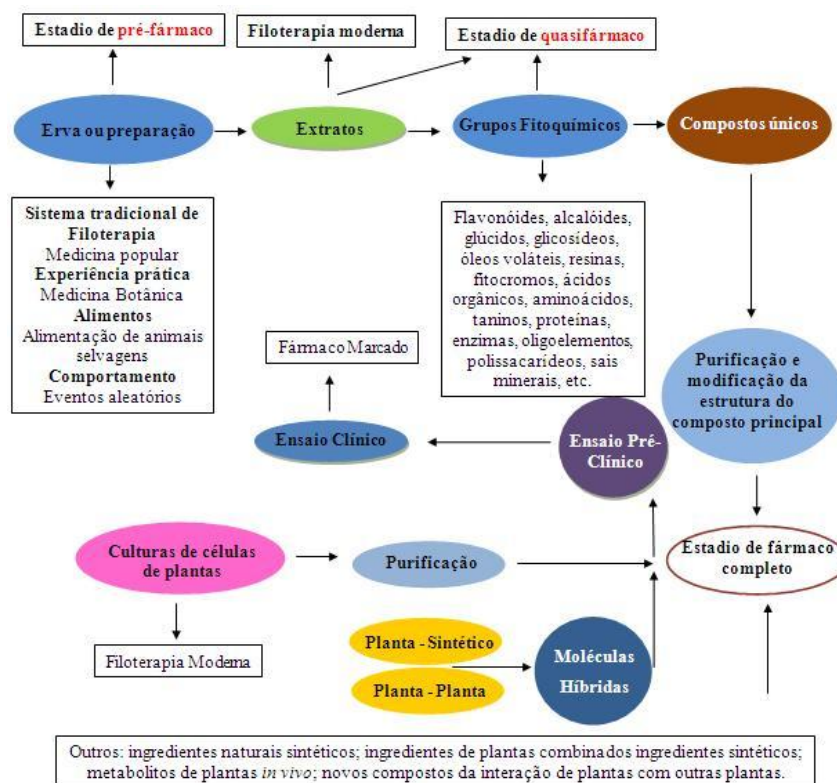


Figura 3 – Abordagens correntes para a descobertas de fármacos a partir de plantas medicinais (Pan *et al.*, 2013)

## 1.4 Metabolitos secundários e o seu papel

À nossa semelhança, a vida das plantas depende de processos metabólicos, que produzem compostos orgânicos, ou metabolitos, sendo estes divididos em dois grupos, os metabolitos primários e os metabolitos secundários. Metabolismo primário é o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial na planta, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas, como é o caso dos aminoácidos, dos nucleótidos, dos lipídios, dos hidratos de carbono e da clorofila. Por outro lado, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas, tendo como consequência o facto desses compostos poderem ser utilizados em estudos taxonómicos. Os precursores normalmente derivam de vias metabólicas básicas, tais como a glicólise e o ciclo de Krebs (Wink, 2010).

Embora os produtos naturais, particularmente os metabolitos secundários, formem a base dos fármacos, a presença destes compostos na bioquímica da planta é muitas vezes difícil de justificar. Pensa-se que estes compostos podem ser sintetizados pela planta, como parte do seu sistema de defesa, por exemplo, existem plantas que produzem fitoalexinas (produtos naturais com atividade inibidora) em resposta ao ataque por bactérias e fungos. Contudo, durante as últimas décadas, algumas evidências experimentais e circunstanciais tornaram claro que muitos dos metabolitos secundários têm, de facto, várias funções que são vitais para as plantas. Essas funções compreendem a defesa contra alguns herbívoros, contra fungos, bactérias e vírus, defesa contra outras plantas que competem por luz, água e nutrientes, defesa contra a luz ultravioleta (UV), entre outras (Wink, 2010). Independentemente de quais sejam as razões para a presença destes compostos na Natureza, eles fornecem um recurso valioso que tem sido utilizado para localizar novas moléculas para a produção de medicamentos (Gurib-Fakim, 2005; Wink, 2010).

Os metabolitos secundários podem ser agrupados em 3 grandes grupos, de acordo com a sua composição química: terpenos, fenóis e alcalóides (Wink, 2010).

#### 1.4.1 Terpenos

Também denominados de terpenóides, os terpenos são dímeros, trímeros ou polímeros de isoprenos (figura 4), dependendo das combinações das unidades (Prasanthi e Lakshmi, 2012) feitas a partir dos seus precursores universais, o pirofosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalilo (DMAPP), provenientes da acetil-Coenzima A (acetil-CoA) e geralmente através da via do mevalonato (Hecht *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2002). As unidades dos isoprenos geralmente formam cadeias lineares ou compostos em anel, contendo 10 átomos de carbono (monoterpenos, C<sub>10</sub>), 15 átomos de carbono (sesquiterpenos, C<sub>15</sub>), 20 átomos de carbono (diterpenos, C<sub>20</sub>) ou 30 átomos de carbono (triterpenos, C<sub>30</sub>).

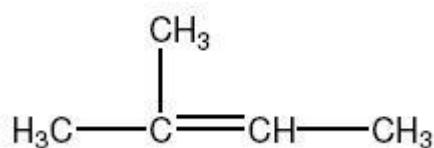


Figura 4 – Unidade de Isopreno (adaptado de Gurib-Fakim, 2005).

#### 1.4.1.1 Monoterpenos

Os monoterpenos são os mais simples dos componentes dos terpenos, sendo comumente encontrados em óleos essenciais. Estão incluídos neste grupo iridóides e piretrinas, sendo alguns destes compostos tóxicos para animais de sangue frio. São por isso usados como inseticidas, mas também têm as propriedades analgésica e anti-inflamatória sobre *Harpagophytum* spp. (Gurib-Fakim, 2005).

#### 1.4.1.2 Sesquiterpenos

Sesquiterpenos também são constituintes de óleos essenciais de muitas plantas como, por exemplo o bisabolol, humuleno e cariofileno. Existem lactonas sesquiterpénicas em famílias como a *Asteraceae*. Estes compostos possuem uma vasta gama de atividades, devido à sua porção  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona e epóxidos. Estes compostos são antibacterianos, antifúngicos, antihelmínticos, antimaláricos e moluscicidas. Como exemplo temos a santonina (figura 5), que é utilizado como um antihelmíntico e como um antimalárico (Gurib-Fakim, 2005).

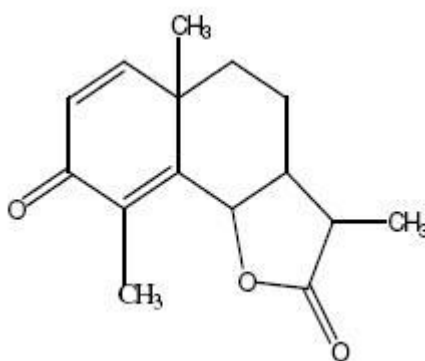


Figura 5 -  $\alpha$ -santonina (adaptado de Gurib-Fakim, 2005).

#### 1.4.1.3 Diterpenos

Estando presentes em animais e plantas, estes compostos têm algumas aplicações terapêuticas. Substâncias como o taxol e os seus derivados são utilizados como medicamentos anticancerígenos. Como outros exemplos temos a forskolina, que atua na hipertensão, o zoapatanol que é um abortivo e o stevoside que é um edulcorante e a ginkgo biloba (figura 6) (Gurib-Fakim, 2005).

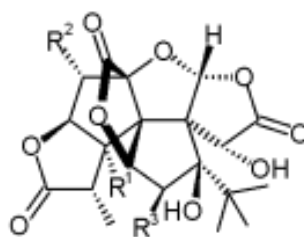


Figura 6 – Estrutura de ginkgolídeo, exemplo de diterpeno presente na Ginkgo Biloba (adaptado de Gurib-Fakim, 2005).

#### 1.4.1.4 Triterpenos

Os triterpenos são compostos  $C_{30}$  resultantes da ciclização do esqualeno, e têm estruturas semelhantes aos esteróides, apesar de terem vias de biossíntese diferente. O oleanano é um exemplo de um triterpeno pentacíclico e a testosterona de um esteróide.

Muitos esteróides naturais juntamente com um grande número de compostos esteróides sintéticos e semissintéticos são utilizados em medicina (por exemplo, saponinas, glicosídeos cardioativos, hormonas corticosteróides e hormonas sexuais). Sendo assim as aplicações farmacêuticas dos triterpenos e dos esteróides são consideráveis. Os glicosídeos cardíacos têm sido usados na medicina, em substituição de fármacos sintéticos, e as saponinas, extraídas a partir de ginseng (figura 7) e alcaçuz, apresentam muitos efeitos terapêuticos (Gurib-Fakim, 2005).

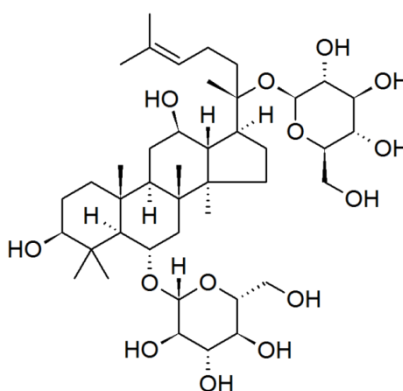


Figura 7 – Estrutura do ginsenosídeo, exemplo de triterpeno presente no Ginseng (adaptado de Gurib-Fakim, 2005).

## 1.4.2 Fenóis

São o maior grupo de metabolitos secundários nas plantas. Eles variam de estruturas simples, com um anel aromático até polímeros complexos tais como taninos e lenhinas. Diferem dos lípidos por serem mais solúveis em água e menos solúveis em solventes orgânicos não polares, e são sintetizados pela via do ácido chiquímico ou pela via do acetato. Têm um grande espectro de aplicações farmacêuticas, como anti-inflamatórios, analgésicos, anticancerígenos, antioxidantes, vasodilatadores, entre outros. Nas plantas, eles protegem contra os herbívoros (Gurib-Fakim, 2005; Wink, 2010). Algumas das classes de fenóis com interesse farmacêutico são as cumarinas, flavonóides e quinonas.

### 1.4.2.1 Flavonóides

Os flavonóides (figura 8) são compostos responsáveis pela cor das flores, frutas e às vezes das folhas. Protegem a planta contra os efeitos dos raios UV prejudiciais e desempenham um papel na polinização, atraindo animais pelas cores. Derivam de uma combinação da via ácido chiquímico e da via do acetato, onde pequenas diferenças nos padrões de substituição da base levam à origem de vários subgrupos.

Recentemente, estes compostos têm atraído interesse devido à descoberta das suas atividades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena, entre muitas outras. Os flavonóides biologicamente ativos compreendem a hesperidina e rutina para diminuir a fragilidade capilar e a quercetina, que atua como antidiarreico (Gurib-Fakim, 2005).

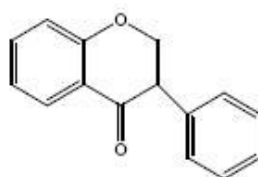
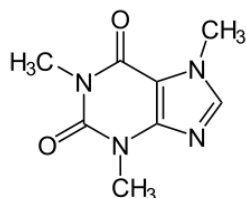


Figura 8 – Estrutura de isoflavanóide, exemplo de um flavonóide (adaptado de Gurib-Fakim, 2005).

## 1.4.3 Alcalóides

O termo alcalóide tem sido definido como um composto orgânico cíclico, contendo azoto num estado de oxidação negativa, que tem uma distribuição limitada em organismos vivos. Com base nas suas estruturas, os alcalóides são divididos em vários

subgrupos: alcalóides não-heterocíclicos e alcalóides heterocíclicos, os quais são outra vez divididos em 12 grupos principais de acordo com a sua estrutura básica em anel (figura 9). A mescalina é um exemplo de um não-heterocíclico ou pseudo-alcalóide.



**Figura 9 – Estrutura da cafeína, exemplo de um pseudo-alcalóide (adaptado de Gurib-Fakim, 2005).**

Os alcalóides livres são solúveis em solventes orgânicos e reagem com ácidos para formar sais solúveis em água. Existem exceções como a berberina. A maioria dos alcalóides são sólidos, com exceção para a nicotina, a qual é um líquido.

Estes compostos desempenham um papel importante na proteção e germinação das plantas, sendo também estimulantes para o seu crescimento. Exemplos de plantas ricas em alcalóides são, *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Apocynaceae*, *Berberidaceae*, *Leguminosae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae* e *Solanaceae*.

Os alcalóides têm muitas propriedades farmacológicas. Como grandes exemplos temos a morfina, que é um analgésico narcótico, a codeína, usada no tratamento da tosse, a colchicina, usada no tratamento da gota, a quinina, usada no tratamento da malária e a quinidina, que é um antiarrítmico (Gurib-Fakim, 2005).

## 1.5 Métodos utilizados na caracterização das plantas

### 1.5.1 Extração de compostos bioativos

Quando se colhe uma planta e se pretende investigar as suas propriedades terapêuticas, é necessário começar por extrair os compostos bioativos. Atualmente, o fracionamento biomonitorizado de plantas medicinais é utilizado na rotina, na tentativa de isolar os componentes bioativos de fontes naturais. Técnicas como esta, não são limitadas a fontes vegetais, também são aplicados às fontes microbianas e mesmo a metabolitos fúngicos (Gurib-Fakim, 2005).

No caso das plantas, quando o material vegetal é recolhido, deve ser logo identificado por um taxonomista de modo a determinar a identidade correta do material, devendo sempre ser mantidas amostras dos espécimes no herbário. Várias partes da planta são recolhidas separadamente (folhas, flores, caule, madeira, casca, raiz, casca da raiz, etc.) e devem ser secas rapidamente. A secagem rápida evita a degradação dos componentes pelo ar ou por micróbios. Por vezes, as amostras de plantas são liofilizadas sob vácuo elevado, mas, mais uma vez, deve ter-se cuidado de modo a evitar a perda excessiva de componentes voláteis, os quais que podem também exibir atividades biológicas relevantes (Gurib-Fakim, 2005). Quando o material está seco, mantém um peso constante, pelo que a partir daí pode ser trabalhado. Geralmente é moído em pedaços menores, e os compostos ativos são extraídos geralmente por um gradiente do solvente de extração. É de extrema importância, que, quer a validação etnobotânica, quer a extração dos compostos não seja feita por pessoas inexperientes de modo a que os mesmos produtos bioativos naturais sejam extraídos corretamente (Gurib-Fakim, 2005; Sasidharan *et al.*, 2011). Esta é uma fase muito importante no processo, uma vez que se a técnica de extração não for bem executada, pode resultar na perda de acesso aos componentes ativos.

Para a obtenção do extrato que se pretende da planta, os procedimentos mais comuns são a descasca, a trituração (geralmente com pilão), a decocção e a maceração. Na maioria das receitas utilizadas pelos curandeiros da Guiné, apenas se usa um componente vegetal, mas pode haver uma ou mais associações de componentes, sendo utilizado na maioria das receitas as folhas das plantas (Indjai *et al.*, 2010). Outras partes também utilizadas são as raízes e a casca do tronco. As vias de administração dependem da condição a tratar, mas a administração oral é a mais comum, seguida da via tópica, do banho e da inalação, podendo em alguns casos ser feita por mais do que uma via. Métodos de extração inadequadas podem resultar na degradação do produto natural. Há muitas outras técnicas de extração, entre as quais se destacam (Gurib-Fakim, 2005; Sasidharan *et al.*, 2011):

- Extração a frio: o material vegetal é extraído com solventes de diferentes polaridades, à temperatura ambiente. Ela permite a extração máxima da maioria dos componentes. Podem ser usados solventes como o metanol, etanol, entre outros. Estas

extrações podem também ser feitas mediante frações, ou seja, o solvente escolhido pode não ser usado a 100%, mas também pode ser conjugado com outros solventes.

- Percolação quente: a planta é aquecida no solvente, geralmente sob refluxo. Este método permite a extração de um grande número de metabolitos, a partir do material mais insolúvel como ceras usadas para os produtos naturais lipofílicos.
- Extração em Soxhlet: Talvez seja a técnica de extração mais ampla e comumente utilizada para a extração de produtos naturais, apesar de alguns componentes poderem ser destruídos no processo, este ainda é o melhor método de extração utilizado em química de produtos naturais. Utilizando um extrator Soxhlet, o solvente é aquecido num balão de fundo redondo, e o vapor originado passa para o condensador onde é refrigerado, passando ao estado líquido. O solvente vai assim arrastando os compostos solúveis das amostras. Uma vez que a extração esteja completa, o agente de extração é normalmente concentrado sob vácuo, para grandes volumes ou solventes, e conservado sob azoto para pequenos volumes, assegurando ao mesmo tempo que os produtos voláteis não são perdidos. Os extratos aquosos são geralmente liofilizados e armazenados a 20°C negativos, pois isso reduz a degradação dos produtos naturais bioativo.

Por vezes, ao invés da extração dos componentes bioativos ser feita apenas com um solvente, utiliza-se o método de extração por frações. Geralmente para esta extração fracionada são utilizadas resinas com capacidade de absorção de grandes moléculas devido aos seus grandes poros e à sua grande capacidade de absorção/desabsorção. O procedimento geral envolve a adição do extrato vegetal a estas resinas e depois da secagem, estas são submetidas a alguns solventes que vão extrair os componentes faseadamente de acordo com a sua constituição química. Um exemplo é o metanol, que é um bom solvente para fazer a extração dos compostos antioxidantes (Andreo e Jorge, 2006).

### **1.5.2 Caracterização dos extratos vegetais**

Após a obtenção do extrato, a atividade deste pode ser demonstrada por métodos de bioensaio utilizando tanto o extrato em bruto como usando os extratos fracionados, podendo a caracterização dos seus compostos bioativos ser feita por várias metodologias fitoquímicas, bioquímicas ou biológicas.

### 1.5.2.1 Metodologias Fitoquímicas

As metodologias fitoquímicas utilizam geralmente o fracionamento químico dos produtos. No fracionamento existe a vantagem de se obter o material biologicamente ativo mais rapidamente. As técnicas de cromatografia têm sido fundamentais para a separação destes produtos naturais. Os dois principais exemplos de técnicas de cromatografia são:

- Cromatografia em Camada Fina (TLC): Método simples, rápido e económico, este permite a separação de componentes em misturas, dependendo da diferença entre o comportamento dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares e efeitos de afinidade e solubilidade. Esta técnica é realizada sobre uma placa de vidro, plástico ou alumínio, revestida com uma camada fina de material absorvente (por exemplo, sílica-gel), sendo então esta camada absorvente a fase estacionária. As amostras a separar são colocadas nas placas a uma distância de segurança do solvente, ou mistura de solventes (fase móvel), que são separados através de ação capilar. A migração do solvente separa a mistura dos compostos, de acordo com as suas polaridades. Outra grande vantagem desta técnica é que permite testar um grande número de amostras em simultâneo. Testes adicionais envolvem a pulverização de reagentes de triagem fitoquímica, que causam alterações de cor de acordo com os fitoquímicos existentes num extrato de plantas, ou exibindo a placa sob a luz UV. Isto também tem sido utilizado para a confirmação da pureza e identificação dos compostos isolados. Esta pulverização permite, entre muitos outros metabolitos secundários, fazer a identificação de terpenos, fenóis e alcalóides (Quach *et al.*, 2004; Gurib-Fakim, 2005; Sasidharan *et al.*, 2011);

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC): As separações químicas são realizadas utilizando o facto de que certos compostos têm diferentes taxas de migração, sendo a extensão ou grau de separação em grande parte determinada pela escolha da fase estacionária e da fase móvel. Para esta técnica são necessários, um sistema de solvente, uma bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de tratamento de dados. Uma vez que são utilizadas elevadas pressões, esta técnica permite a redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada dentro da coluna

cromatográfica. Os detetores usados podem ser, por exemplo, de UV. Apesar de ser uma técnica cara, é a mais utilizada na indústria farmacêutica (Gurib-Fakim, 2005; Sasidharan *et al.*, 2011).

#### 1.5.2.2 Metodologias Químicas

As metodologias químicas utilizam as propriedades químicas dos extratos, para a sua identificação e compreensão. A determinação dos componentes químicos de cada extrato pode-nos indicar que tipo de atividade pode ser esperada e explicar algumas das reações obtidas quando estes extratos são expostos a organismos vivos. Como três exemplos de compostos químicos que podem ser quantificados temos os polifenóis, o óxido nítrico e os antioxidantes (ABTS [2,2'-azinobis{3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico}])).

Os polifenóis têm vindo a emergir como uma categoria importante de produtos naturais que são essenciais para a saúde humana, pois tem sido demonstrado que são bons antioxidantes, eficazes na prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias. Alguns dos produtos de origem vegetal ricos em polifenóis são, por exemplo, o chá e as uvas. Além dos polifenóis de plantas terrestres, tem sido demonstrado que outra fonte de polifenóis com propriedades estruturais únicas são os florotaninos, um tipo especial de compostos polifenólicos amplamente distribuídos em algas castanhas. A sua atividade antioxidante é uma das mais estudadas e várias espécies de algas castanhas como *Sargassum kjellmanianum*, *Eisenia bicyclis*, *Cystoseira sp.*, *Fucus sp.*, e *Ecklonia stolonifera* têm sido descritas face à relação de eliminação de radicais livres e inibição da geração de espécies reativas de oxigénio nestes compostos. Mais recentemente, floroglucínóis (tipo de polifenol) de algas castanhas revelaram ter propriedades bactericidas, serem inibidores de hialuronidases, possuírem propriedades quimiopreventivas e terem efeitos na inibição de proteases e da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência adquirida 1 (HIV-1). Também demonstraram conter atividade antioxidante e anti-inflamatória (Zhang *et al.*, 2006).

Entre os vários ensaios disponíveis para quantificar os polifenóis totais, o método de Folin-Denis foi durante muito tempo o mais utilizado (Zhang *et al.*, 2006). Este baseia-se numa reação colorimétrica entre os polifenóis facilmente oxidados ou os compostos aromáticos hidroxilados e o ácido fosfotungstato-molíbdeno. Contudo, este

foi melhorado pelo método de Folin-Ciocalteu, com a adição de sulfato de lítio ao reagente, para evitar a precipitação na reação, a fim de aumentar a sensibilidade (Zhang *et al.*, 2006). Atualmente, o reagente de Folin-Ciocalteu está disponível comercialmente para a quantificação de polifenóis e é considerado um ensaio de referência. Este método incorpora a comodidade da medição espectrofotométrica utilizando microplacas de 96 poços (Zhang *et al.*, 2006).

O óxido nítrico está presente quer em animais quer em plantas. O oxigénio é um elemento importante para a vida e a oxidação é uma parte fundamental da vida aeróbia e do nosso metabolismo. Todos os sistemas vivos evoluíram para sobreviver na presença de oxigénio molecular. As propriedades oxidantes do oxigénio desempenham um papel vital em muitos fenómenos biológicos, contudo estas propriedades agravam os danos no interior da célula por eventos oxidativos (Singh *et al.*, 2012). Os radicais livres são compostos altamente reativos, sendo constituídos por eletrões não emparelhados e podem ser formados quando o oxigénio interage com determinadas moléculas. Quando produzidos em excesso, estes radicais livres causam danos oxidativos nas células, fazendo-as perder a sua estrutura e função, podendo danificar um grande número de componentes celulares, tais como proteínas, lípidos, enzimas e ADN (Balakrishnan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012). Estes danos acabam por conduzir a muitas doenças crónicas, tais como cancro, diabetes, artrite, cataratas e doenças degenerativas relacionadas com a idade. O óxido nítrico (ON) é um radical livre, conhecido pelos seus efeitos de regulação fisiológicos, que incluem o controlo da pressão arterial, a transdução de sinais neurais, a função plaquetar, a atividade antimicrobiana e antitumoral. No entanto o ON também apresenta propriedades tóxicas após reação com radicais de oxigénio e superóxido, uma vez que os produtos desta reação são capazes de provocar muitos danos celulares.

Sendo as plantas tradicionalmente usadas como agente terapêutico, muitas vezes devido à sua atividade antioxidante, é importante quantificar espectrofotometricamente a atividade do ON nos extratos que são obtidos a partir das plantas. O método utilizado, usa o nitroprussiato de sódio (SNP), em solução aquosa e gera espontaneamente ON, que ao interagir com o oxigénio produz iões nitrito, que podem ser medidos espectrofotometricamente, na presença do reagente de Griess (Balakrishnan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012). Este reagente deteta a presença de compostos orgânicos de nitrito,

baseando-se na reação química de diazotização, que utiliza a sulfamida e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina sob condições ácidas (ácido fosfórico). Assim, ao extrato da planta é adicionado SNP e após um período de incubação é-lhes adicionado o reagente de Griess, sendo de seguida medida a absorvância da cor obtida. Para traçar o padrão da reação utiliza-se o ácido ascórbico.

O ABTS é um composto químico utilizado para observar cinéticas de reações, podendo ser utilizado também para medição da atividade total de antioxidantes em soluções de substâncias puras. Este radical precisa de ser gerado por reações químicas (por exemplo, através de persulfato de potássio) ou enzimáticas, sendo solúvel quer em água quer em solventes orgânicos. Nos extratos de plantas, quando há a adição do persulfato de potássio, ocorre a formação do radical ABTS<sup>+</sup>, que tem uma cor esverdeada (Mayur *et al.*, 2010). À medida que o antioxidante presente na amostra se mistura com este radical, ocorre a redução do ABTS<sup>+</sup> a ABTS, havendo uma perda da coloração do meio reacional. Deve ser sempre feito este processo em triplicado (Re *et al.*, 1999). O ácido ascórbico pode ser utilizado como padrão e a percentagem da atividade de redução do ABTS é depois calculada, através da utilização da fórmula:

$$\% \text{ atividade redução} = \frac{1 - (\text{absorvância da amostra})}{\text{absorvância do controlo}} \times 100$$

A principal vantagem deste método é a sua facilidade de execução, podendo ser facilmente reproduzido, oferecendo rápida e facilmente uma percentagem da atividade de redução, dada pelos antioxidantes presentes na solução (Mayur *et al.*, 2010).

Utilizando ADN plasmídico, podemos também compreender algumas das características das plantas medicinais. Se existirem antioxidantes presentes nos extratos destas plantas, podemos analisar o efeito protetor que estes têm no impedimento do fenómeno de ADN *nicking*. O ADN superenrolado de plasmídeos conhecidos é exposto a diferentes concentrações de extratos vegetais, sofrendo uma pequena incubação, seguida da adição do reagente de Fenton (Kumar *et al.*, 2010; Sekhar *et al.*, 2013). Este reagente gera radicais hidroxilo a partir da reação em cadeia entre o ião ferroso (Fe<sup>2+</sup>) e o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (constituintes do reagente) em meio ácido, sendo

bastante eficiente na oxidação de compostos orgânicos tóxicos e não biodegradáveis (Aviello *et al.*, 2011). Assim o ADN plasmídico que entre em contato com este reagente torna-se num ADN circular com quebras em ligações fosfodiéster. Quando há a presença de antioxidantes na amostra, essa quebra é proporcionalmente revertida e o ADN volta a possuir uma forma superenrolada. Assim, consegue-se determinar se o extrato é ou não rico em antioxidantes. Reagentes como o ácido ascórbico podem ser utilizados como controlo positivo da reação.

### 1.5.2.3 Metodologias Biológicas

As metodologias biológicas compreendem a utilização de modelos animais de laboratório, para testar as propriedades dos compostos. Em fases iniciais, os testes *in vitro* têm prioridade sobre os estudos *in vivo*, sendo para isso usados modelos de células animais. Qualquer componente bioativo que seja candidato para aplicação terapêutica tem assim que passar por um grande conjunto de programas de triagem clínicos e toxicológicos antes de chegarem a ser registados como medicamentos. Existem vários tipos de testes biológicos *in vitro*, que são aplicados na análise farmacológica dos extratos, sendo específicos para bactérias, fungos, protozoários, vírus, entre outros (Atindehou *et al.*, 2004; Muthaura *et al.*, 2007). Estes métodos são importantes, visto determinarem a atividade dos compostos sobre estes seres vivos, podendo fornecer pistas sobre a sua atividade *in vivo*. Geralmente, neste tipo de ensaios são muito utilizados pequenos crustáceos, bactérias e fungos (Gurib-Fakim, 2005; Valgas *et al.*, 2007).

#### 1.5.2.3.1 *Artemia salina*

Pequenos animais aquáticos, como a *Artemia salina*, podem ser cultivadas em soluções semelhantes à água do mar. A fim de testar a toxicidade potencial, são adicionadas concentrações pré-estabelecidas dos extratos das plantas, a recipientes com um número conhecido destes pequenos crustáceos. As *Artemia* sobreviventes são contadas ao fim de 24 horas, e os valores para a dose letal mediana (LC50, dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste) são encontrados, através da diferença de contagem dos crustáceos que estavam vivos aquando a adição do extrato e dos que ficaram vivos após as 24h em contacto com o

composto (Parra *et al.*, 2001; Pisutthanan *et al.*, 2004). *A. salina* é muito utilizada em bioensaios de toxicidade, uma vez que Michael *et al.* (1956) utilizaram e testaram este molusco, tendo concluído que era ideal para realizar esse tipo de ensaios.

#### 1.5.2.3.2 Bactérias

As bactérias são outro grande grupo de microrganismos utilizado em bioensaios. Podem ser cultivadas em meio de agar em placas de Petri, e são colocadas em pequenas cavidades na superfície do agar uma concentração definida do extrato da planta. Após uma incubação de 18 a 24 horas, são observados os halos de inibição onde ocorreu a inibição do crescimento bacteriano, devido à ação inibitória dos compostos. Os fungos também podem ser testados através do mesmo método (Atindehou *et al.*, 2004; Gurib-Fakim, 2005; Valgas *et al.*, 2007). Em bactérias é utilizada a técnica de determinação da concentração mínima inibitória (CMI), em que se utiliza uma placa de 96 poços sobre a qual é aplicada uma determinada concentração de bactérias por poço, em meio de crescimento. Fazendo-se sucessivas diluições a partir de uma determinada concentração do extrato da planta e após uma incubação de 18 a 24h, é determinada qual a concentração mais baixa do extrato que inibe o crescimento do microrganismo, determinando assim a CMI (Atindehou *et al.*, 2004; Valgas *et al.*, 2007; Lagnika *et al.*, 2011). Geralmente utiliza-se o reagente violeta de p-iodonitrotetrazólio (INT) para a revelação do crescimento bacteriano. Este comporta-se como recetor de eletrões de várias desidrogenases e assim, sempre que há crescimento, essas desidrogenases perdem eletrões que vão ser transferidos para o INT, formando um corante rosado. Em resumo, sempre que há presença de cor rosada nos poços, é porque houve crescimento bacteriano, e o extrato não foi inibitório.

Podem ser usadas para a determinação da CMI de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo preferível usar de ambos os tipos, para não ficar dúvida se os efeitos dos extratos são afetados pela composição da membrana da bactéria.

#### 1.5.2.3.3 Células Animais

A toxicidade dos extratos vegetais pode ser determinada utilizando células animais. A cultura de células animais (cultura de tecidos ou de células sanguíneas/hematopoiéticas ou outras) inicia-se pela dispersão das células obtidas a

partir de um fragmento de tecido (hematopoiético, muscular, epitelial ou outro) num meio nutritivo apropriado, colocado num frasco ou placa de cultura. Após algum tempo, verifica-se que a maioria das células adere à superfície sólida e cresce em monocamada ou em suspensão, dependendo do tipo celular. Na cultura em monocamada, as células vão aderir à superfície da placa e propagam-se. É o método mais usado e tem como condição essencial a ancoragem (adesão das células ao fundo dos poços), que é um pré-requisito indispensável à proliferação celular. Para as células aderentes, o material de cultura deve possuir uma carga negativa. Essa carga medeia a produção de proteínas de adesão e proteoglicanos que irão iniciar o processo de adesão da célula à superfície do frasco ou placa. A cultura em suspensão é utilizada para células que sobrevivem e proliferam sem necessidade de adesão (independente da ancoragem). É o caso das células hematopoiéticas, das linhas celulares transformadas ou das células derivadas de alguns tumores malignos de órgãos sólidos (Balakrishnan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012).

Assim que toda a camada de substrato da cultura for ocupada e as células confluírem, estabelecendo contacto umas com as outras, surge a necessidade de proceder a subculturas sucessivas, sendo feita a passagem destas células para outros frascos ou placas de cultura. As células que crescem em monocamada necessitam de sofrer uma desagregação da superfície do frasco ou placa, podendo esta ser enzimática (a tripsina é a enzima mais utilizada, por ser a melhor tolerada) ou mecânica. Para a manutenção das células em cultura é necessário que a incubação ocorra em meio de cultura, com soro fetal, numa atmosfera apropriada e controlada quanto à temperatura, à humidade e à composição da fase gasosa. A maioria requer uma atmosfera pobre em oxigénio, embora variável de acordo com as necessidades específicas das células em causa. A concentração de CO<sub>2</sub>, superior à da atmosfera normal, é igualmente fundamental para o sucesso das culturas celulares, sendo frequentemente necessário adicionar este gás à atmosfera em que as células se encontram, sendo geralmente utilizada uma percentagem de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura escolhido, suplementado com o soro fetal, é igualmente fundamental e indispensável, uma vez que é este que fornece nutrientes, hormonas, fatores de crescimento e outros substratos essenciais à expressão de funções especializadas das células, sustentando o seu

crescimento contínuo, substituindo e reproduzindo *in vitro*, o melhor possível, as condições *in vivo*, dos modelos animais (Singh *et al.*, 2012).

Existem células primárias e células estabelecidas. As culturas de células primárias são constituídas por um único tipo de células, que se propaga em série durante um número limitado de divisões celulares. Já as células tumorais, ou células estabelecidas, propagam-se indefinidamente devido ao facto de terem sido transformadas. As linhas de células tumorais derivam, frequentemente, de tumores reais, contudo, podem ser criadas por indução, utilizando oncogenes virais ou tratamentos químicos (Balakrishnan *et al.*, 2009). Já com base na sua morfologia (forma e aparência), ou nas suas características funcionais, as células para cultura podem ser divididas em três tipos:

- Eiteliais: células que aderem ao substrato e apresentam forma achatada e poligonal.
- Linfoblásticas: células que, normalmente, não aderem ao substrato, permanecendo em suspensão com uma forma esférica.
- Fibroblásticas: células que aderem ao substrato e apresentam-se alongadas e bipolares.

Algumas das linhas celulares que são mais utilizadas são as linhas celulares de primatas, como as células Vero (células epiteliais do rim de macaco verde africano) e as Cos-7 (células do rim do macaco verde africano), as linhas celulares de humanos, como as células HeLa (células do epitélio cervical), células HEK 293 (células do epitélio do rim), células Hep G2 (epitélio do fígado), bem como outras, derivadas de pequenos roedores e outros animais.

Na tabela I podemos ver algumas das linhas celulares quanto à sua origem, morfologia e tipo de crescimento (aderentes ou não aderente).

**Tabela I - Diferentes linhas celulares (adaptado de Sigma-Aldrich, 2010).**

<b>Linhas celulares aderentes</b>		
<b>Nome</b>	<b>Tecido e Espécie de Origem</b>	<b>Morfologia</b>
<b>MRC-5</b>	Pulmão Humano	Fibroblasto
<b>HeLa</b>	Cérvix Humano	Epitelial
<b>Vero</b>	Rim de Macaco Verde Africano	Epitelial
<b>NIH3T3</b>	Embrião de Rato	Fibroblasto

<b>L929</b>	Tecido Conectivo de Rato	Fibroblasto
<b>CHO</b>	Ovário de Hamster Chinês	Fibroblasto
<b>BHK-21</b>	Rim de Hamster Sírio	Fibroblasto
<b>HEK 293</b>	Rim Humano	Epitelial
<b>Hep G2</b>	Fígado Humano	Epitelial
<b>SH-SY5Y</b>	Neuroblastoma Humano	Neuroblasto
<b>Linhas celulares não aderentes</b>		
<b>Nome</b>	<b>Tecido e Espécie de Origem</b>	<b>Morfologia</b>
<b>N50</b>	Mieloma de Rato	Linfoblasto
<b>U937</b>	Linfoma Histiocítico Humano	Linfoblasto
<b>Namalwa</b>	Linfoma Humano	Linfoblasto
<b>HL60</b>	Leucemia Humana	Linfoblasto
<b>WEHI 231</b>	Linfoma das células B de Rato	Linfoblasto
<b>YAC 1</b>	Linfoma de Rato	Linfoblasto
<b>U266B1</b>	Mieloma Humano	Linfoblasto

Para as culturas celulares, quando queremos testar extratos vegetais e similarmente às culturas bacterianas, utilizam-se microplacas de 96 poços e é aplicada uma determinada concentração de células por poço, em meio de crescimento apropriado, procedendo-se de seguida a sucessivas diluições a partir de uma determinada concentração do extrato da planta. Depois de uma incubação de 18 a 24h, vai-se poder determinar qual a concentração mais baixa do extrato que inibe o crescimento das células, determinando assim a CMI do extrato vegetal (Atindehou *et al.*, 2004; Lagnika *et al.*, 2011).

Outro método para a determinação da atividade citotóxica dos extratos vegetais é a determinação do LC50, que não é mais do que a medida padrão da toxicidade do meio envolvente, em que metade da população celular da amostra (50%) de um teste específico, em um determinado período, fica inviável por exposição a um determinado composto. Este pode utilizar para a determinação da viabilidade e proliferação celular, a redução de sais de tetrazólio. O tetrazólio amarelo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), é obtido pelas células metabolicamente ativas, em parte pela ação nas desidrogenases presentes nas mitocôndrias, para gerar equivalentes redutores. Formam-se então cristais de formazano púrpura a nível intracelular, que

podem ser solubilizados e quantificados através de espectrofotometria (ATCC, 2011). Podem ser utilizados outros reagentes semelhantes como o XTT e o MTS.

#### 1.5.2.3.4 Parasitas

A toxicidade e os efeitos dos extratos vegetais também podem ser avaliados em parasitas. Têm sido desenvolvidos uma série de medicamentos que podem ser usados contra parasitas. Porém, como a maioria destes fármacos foi desenvolvida há já alguns anos, algumas das estirpes de parasitas tornaram-se resistentes a esses fármacos. A maioria destes medicamentos foram obtidos através de síntese, no entanto, com o aumentar das resistências parasitárias, uma alternativa a este tipo de fármacos podem ser os fármacos produzidos a partir de extratos vegetais, sendo a busca por plantas com capacidades antiparasitárias, um dos maiores interesses da farmacologia nos dias de hoje. Pode-se destacar um exemplo do uso de plantas medicinais, pois os primeiros medicamentos usados para tratar a malária são provenientes da planta *Cinchona officinalis* e de outras espécies de *Cinchona* (Rubiaceae), que foram encontradas naturalmente na América do Sul e Central (Mayur *et al.*, 2010). Exemplos como este ajudam a corroborar a importância de encontrar plantas com capacidade antiparasitária, como alternativa aos fármacos de origem sintética, utilizados hoje em dia.

Existem muitos parasitas patogénicos para os humanos contra os quais se procuram fármacos naturais, podendo destacar-se *T. gondii*, que provoca toxoplasmose.

Esta doença é uma antropozoonose de distribuição mundial que afeta quase um terço da população humana, assim como os animais homeotérmicos. A infeção pode ocorrer por via oral, por contacto sanguíneo ou ser adquirida por via congénita. *T. gondii* necessita tanto dos hospedeiros definitivos (felinos) como dos hospedeiros intermediários para completar as fases do seu ciclo de vida, quer por replicação assexuada quer sexuada (Hecht *et al.*, 2001; Prasanthi e Lakshmi, 2012). A fase de replicação sexuada só ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos, os felinos (Sasidharan *et al.*, 2011; Prasanthi e Lakshmi, 2012), e a fase de replicação assexuada ocorre em células nucleadas. Todos os animais de sangue quente podem ser infetados principalmente através do consumo de alimentos ou bebidas contaminadas por oocistos evacuados nas fezes dos felídeos ou por quistos tecidulares dos hospedeiros intermediários (Hecht *et al.*, 2001; Prasanthi e Lakshmi, 2012). Uma vez ingeridos, os

oocistos e/ou quistos tecidulares sofrem ruptura ao longo do tubo digestivo e invadem as células da mucosa intestinal, e os esporozoítos (libertados dos oocistos) ou os bradizoítos (libertados a partir dos quistos nos tecidos) diferenciam-se em taquizoítos, a forma rápida de replicação do parasita. Estes taquizoítos podem ser detetados nos leucócitos do hospedeiro ou podem circular livremente na corrente sanguínea. Após várias divisões por endodiogenia, os taquizoítos transformam-se em bradizoítos para fugir à resposta imune do hospedeiro formando quistos nos tecidos parasitados do hospedeiro (Sasidharan *et al.*, 2011). Os oocistos infecciosos excretados podem manter-se viáveis no ambiente até 18 meses (Adam *et al.*, 2002). A transmissão congénita e o transplante de órgãos são também outras vias de infeção (Hecht *et al.*, 2001).

Na maioria dos adultos, a toxoplasmose não causa doença grave, sendo a forma mais comum a latente (assintomática), no entanto, pode causar cegueira e atraso mental em crianças infetadas congenitamente ou originar doenças graves em pessoas com imunidade comprometida (Hecht *et al.*, 2001 e Prasanthi e Lakshmi, 2012). A infeção sintomática é geralmente caracterizada por linfadenopatia e hiperplasia das células reticulares. Na doença congénita, os quadros clínicos das infeções adquiridas durante o primeiro trimestre da gravidez são mais graves do que aquelas adquiridas das infeções no segundo e terceiro trimestres. Algumas consequências da toxoplasmose adquirida durante a gravidez são a hepatite e a pneumonia, seguidas pelo comprometimento do sistema nervoso central (SNC), resultando em hidrocefalia, coriorretinite e calcificações cerebrais. A toxoplasmose ocular pode acontecer após a infeção congénita ou adquirida após nascimento, como resultado de uma infeção aguda ou reativação. Em doentes imunocomprometidos, tal como acontece na síndrome de imunodeficiência adquirida (Sida), a toxoplasmose quase sempre acontece como resultado da reativação de uma infeção crónica. Nestes doentes, os sintomas consistem em alterações do estado mental, convulsões, alterações sensoriais e distúrbios do movimento (Hecht *et al.*, 2001).

Existem diferentes condições que podem afetar a progressão da infeção, tais como: o número de parasitas, a virulência do organismo e o sexo e estado imunológico do hospedeiro (Hecht *et al.*, 2001). Foram identificadas três estirpes de parasitas, tipo I, II e III. A estirpe do tipo I está muito associada a doentes com toxoplasmose ocular. Já a estirpe do tipo II está associada à infeção crónica pela persistência dos quistos tecidulares e é principalmente isolada na Europa e na América do Norte. Os tipos I e II

estão associados a doentes com infeção congénita e doentes com sida. O tipo III e linhagens recombinantes I/III são comuns na América do Sul (Hecht *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2002). A deteção da infeção pode ser documentada por exames sero-imunológicos. A resposta da IgG anti-*T. gondii* surge aproximadamente 7 a 14 dias após a infeção, apresentando o pico ao 30º a 60º dias, geralmente persistindo ao longo da vida, enquanto que a IgM anti-*T. gondii*, apesar de aparecer primeiro, tipicamente não persiste, sendo a sua deteção sinal de infeção aguda. Também a reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma das metodologias usadas no diagnóstico, fazendo-se a pesquisa do ADN do parasita, além da avaliação histológica de tecidos infetados (Sasidharan *et al.*, 2011).

O tratamento humano para a infeção por *T. gondii* é constituído por uma combinação de pirimetamina e sulfadiazina, que inibem a diidrofolato redutase, uma enzima chave na síntese das purinas. Outros fármacos alternativos incluem a clindamicina, a atovaquona e espiramicina. O tratamento das infeções por *T. gondii*, de um modo geral, acentua o problema da eficácia limitada dos agentes anti-parasitários disponíveis, bem como os seus efeitos secundários e a potencial ocorrência de estirpes resistentes. Uma vez que os medicamentos existentes para o tratamento da toxoplasmose podem produzir efeitos secundários graves como a síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica, que geralmente são precedidos de uma erupção cutânea, hemorragias graves, anemia ou até infeções graves, e que estes não atuam sobre os quistos, são necessárias outras opções para o tratamento da toxoplasmose. Como tal, é necessária a pesquisa de novos agentes antiparasitários, sendo de extrema importância a busca de compostos naturais capazes de combater este parasita (De *et al.*, 2010).



## **Capitulo II - Objetivos**

Uma vez que as resistências a fármacos antibacterianos e antiparasitários é um problema cada vez mais grave e urge a necessidade de encontrar fármacos quimiopreventivos, a pesquisa de novos fármacos passa pela procura de plantas que apresentem alguma destas atividades. Assim, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Identificar, em algumas plantas medicinais, compostos biologicamente ativos;
- Testar os componentes das plantas medicinais obtidas, quanto à sua atividade antibacteriana e à sua citotoxicidade, em algumas células animais, pequenos moluscos e parasitas;
- Identificar alguns dos componentes químicos de cada planta medicinal estudada.

## **Capítulo III - Material e Métodos**

### 3.1 Obtenção e produção da biblioteca de compostos

Foram utilizadas um total de 21 plantas (tabela II), com origem na ilha de Orango na Guiné-Bissau, cedidas gentilmente pelos Doutores Luís Catarino e Bucar Indjai, tendo sido numeradas com números no intervalo de 1 a 35. Este material vegetal é composto por amostras de folhas que foram secas à temperatura ambiente, no escuro. Depois de secas, foram pesadas 200 mg destas amostras em triplicado, tendo sido colocadas em tubos de ensaio devidamente numerados.

Tabela II - Plantas testadas e número de amostra correspondente

Nome	Número da amostra
<i>Ficus polita</i>	1
<i>Trichilia prieuriana subesp. prieuriana</i>	5
<i>Margaritaria discoidea</i>	6
<i>Psychotrya peduncularis</i>	7
<i>Combretum micratum</i>	8
<i>Zanthoxylum leprieuri</i>	9
<i>Cassytha filiformis</i>	10
<i>Cisampelos mucronata</i>	11
<i>Capparis erythrocarpus</i>	12
<i>Strophanthus sarmentosus</i>	13
<i>Ocimum gratissimum</i>	15
<i>Ocimum basilicum</i>	16
<i>Abrus precatorius</i>	17
<i>Khaya senegalensis</i>	22
<i>Faidherbia álvida</i>	23
<i>Cnestis ferrugínea</i>	24
<i>Landolphia dulcis</i>	25
<i>Allophylus africans</i>	26
<i>Hymenocardia acida</i>	27
<i>Leptadenia hastata</i>	34
<i>Calyptrorchilum christyanum</i>	35

A cada uma dessas amostras em triplicado, foi adicionado 4 ml de um solvente: metanol, ou clorofórmio, ou etil acetato. Os tubos contendo as amostras foram convenientemente vedados e sujeitos a uma incubação de 2/3 dias à temperatura ambiente, na ausência de luz.

Os tubos de congelação de polipropileno de 2 ml foram devidamente identificados com o número da amostra e tipo de solvente usado na extração e foram pesados, tendo-lhes sido posteriormente adicionado a solução obtida e foram deixados a secar à temperatura ambiente, até o solvente evaporar completamente. Após completa secagem, os tubos foram pesados novamente, e assim se determinou o peso do extrato obtido. Os extratos foram reconstituídos com 400µl de dimetil sulfóxido (DMSO) e guardados a 4°C, ficando assim a biblioteca dos extratos das plantas pronta a ser utilizada (figura 10) (Bézivin *et al.*, 2003).



**Figura 10 – Biblioteca dos extratos**

Foi também calculado para cada extrato a quantidade necessária para perfazer a concentração de 1 mg/ml, utilizando o valor do peso do extrato que tinha sido calculado (anexo A).

Todas as amostras extraídas com o metanol foram também sujeitas a fracionamento utilizando a resina Diaion HP-20 (Supelco). Este método consistiu em colocar 4 ml de extrato que obtivemos por extração com o metanol, em tubos (devidamente identificados com o número de cada amostra) contendo 60 mg da resina acima mencionada (Bugni *et al.*, 2008). Após secagem da resina (2 a 3 dias) esta foi lavada para cada amostra com 7 soluções e o produto da lavagem foi colhido para tubos de centrífuga de 1,5ml devidamente identificados. A ordem das soluções utilizadas para lavar a resina foi:

- Fração W (Water) I: 1 ml de água foi utilizada para lavar a resina em primeiro lugar, tendo ficado a água em contacto com a resina durante 10 minutos;

- Fração VII: 1 ml de água foi utilizado para lavar a resina em segundo lugar, tendo ficado a água em contacto com a resina durante 10 minutos;
- Fração 1: 1 ml de uma solução de 25% de isopropanol em água foi utilizada para executar a terceira lavagem, tendo ficado a solução em contacto com a resina durante 10 minutos;
- Fração 2: 1 ml de uma solução de 50% de isopropanol em água foi utilizada para executar a quarta lavagem, tendo ficado a solução em contacto com a resina durante 10 minutos;
- Fração 3: 1 ml de uma solução de 75% de isopropanol em água foi utilizada para executar a quinta lavagem, tendo ficado a solução em contacto com a resina durante 10 minutos;
- Fração 4: 1 ml de uma solução de metanol a 100% foi utilizada para executar a sexta lavagem, tendo ficado a solução em contacto com a resina durante 10 minutos;
- Fração 5: 1 ml de uma solução de 50% clorofórmio em metanol foi utilizada para executar a sétima lavagem, tendo ficado a solução em contacto com a resina durante 10 minutos.

As frações foram de seguida liofilizadas e dissolvidas em 400 µl de DMSO. Foram depois incorporados à biblioteca de extratos, de forma a serem utilizados em alguns procedimentos.

## 3.2 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em bactérias

### 3.2.1 Avaliação qualitativa da atividade anti-bacteriana

#### 3.2.1.1 Em meio sólido

Neste ensaio foram utilizadas quatro estirpes de referência, nomeadamente *E. coli* (ATCC 25922, Culti-Loops, Thermo Scientific), *P. aeruginosa* (ATCC 27853, Culti-Loops, Thermo Scientific), *S. aureus* (ATCC 25923, Culti-Loops, Thermo Scientific) e *E. faecalis* (ATCC 29212, Culti-Loops, Remel). Estas bactérias foram inoculadas em meio líquido Luris-Bertani (Meio LB), durante 24 horas a 37°C, tendo sido depois obtida da suspensão bacteriana original e a partir desta, foi obtida outra

suspensão na concentração de 0.5 na escala de MacFarlan. Foram identificadas placas de petri com a estirpe com que iam ser inoculadas e o meio Muller-Hinton (meio M-H) foi utilizado para semear cada uma das suspensões bacterianas (Valgas *et al.*, 2007). Cada placa foi inoculada com 200 µl da bactéria, a sementeira foi homogeneamente feita por todas as placas através da técnica de espalhamento em placa. Em cada placa foi inoculado 1 µl de ampicilina (50mg/ml) e 1 µl de DMSO que serviam de controlos. Para cada estirpe foram inoculados 3 µl de todos os extratos das plantas para os 3 solventes, numa concentração de 1 mg/ml. As placas incubaram durante 24 horas a 37°C (Valgas *et al.*, 2007). Os ensaios foram feitos em triplicado. Os halos de inibição obtidos, em cada estirpe, para cada extrato vegetal, foram medidos em mm e apontados. Também para as diferentes frações de todas as amostras foi realizado o mesmo ensaio.

#### 3.2.1.2 Em meio líquido

Foi também utilizado 100µl por poço do meio Muller-Hinton, tendo sido semeadas numa concentração igual (0.5 na escala de MacFarlan) as quatro suspensões bacterianas e foram usadas as frações obtidas dos extratos que haviam sido extraídos com metanol. Foi pipetado para as placas 3 µl de cada fração (1mg/ml), sempre utilizando o DMSO e 1µl de ampicilina (50mg/ml) como controlos. As placas incubaram durante 24 horas a 37°C e as inibições obtidas foram registadas.

Depois de encontrados os extratos e frações de extratos que apresentaram maior atividade antibacteriana, foi realizada a técnica de TLC para testar essas amostras. Para este ensaio foram feitas sete réplicas, quatro para testar as bactérias usadas e três para testar os compostos fitoquímicos dos extratos. Para as frações de extratos que apresentavam maior atividade antibacteriana, foi aplicada a TLC àqueles que provinham de extração por metanol. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10mm). As amostras a separar foram colocadas nas placas a uma distância de segurança da mistura de solventes (9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 de ácido acético) e ocorreu a migração do solvente e conseqüente separação dos componentes dos extratos, de acordo com as suas polaridades. Das 4 réplicas de placas, cada uma delas foi utilizada para um grupo de bactérias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*). Após a corrida dos extratos e secagem das placas, estas foram inoculadas com as quatro suspensões bacterianas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S.*

*aureus* e *E. faecalis*) a 0.5 na escala de MacFarlan (cada suspensão para cada grupo de placas) e depois da incubação de todas as placas a 37°C durante 24 horas, foi-lhes adicionado INT a 0.5 µg/ml. Todos os ensaios anteriormente descritos foram reproduzidos em triplicado. No final os resultados foram fotografados. As três réplicas restantes foram utilizadas para determinação dos compostos fitoquímicos, assunto tratado no capítulo 3.3.

### 3.2.2 Avaliação quantitativa da atividade anti-bacteriana em meio líquido

Em microplacas de fundo redondo de 96 poços esterilizadas, devidamente identificadas para cada espécie de bactéria e com o número das amostras, foi aplicado 50µl de meio *Trypticase Soy Broth* (TSB) líquido e foram colocados os extratos vegetais (em triplicado) numa concentração de 1 mg/ml nos primeiros poços das microplacas, como mostra a figura 11, num volume total de 100 µl, tendo sido feita uma diluição de ½ nos poços subsequentes (Lagnika *et al.*, 2011). Assim, uma vez que a concentração inicial de 1 mg/ml, fazendo diluições de ½ testámos as seguintes concentrações; 0.5 mg/ml; 0.25 mg/ml; 0.125 mg/ml; 0.0625 mg/ml; 0.031 mg/ml; 0.016 mg/ml e 0.0078 mg/ml.

De seguida todos os poços foram inoculados com 50µl da suspensão da bactéria correspondente, numa concentração de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colónias (UFC). Em cada microplaca a última fila de poços foi usada como controlo, dois poços serviram como controlo negativo, contendo apenas meio líquido TSB, outros dois poços continham as suspensões bacterianas com antibiótico (ampicilina) e ainda dois poços com meio TSB e bactérias. Todos os testes foram feitos em triplicado. Depois de uma incubação de 24h a 37°C, foi aplicado por poço, 40 µl de uma solução de 2 mg/ml de p-iodonitrotetrazólio (INT) diluída de 1 para 10 em H<sub>2</sub>O. Após uma incubação de 30 minutos a 37°C. Fez-se a leitura macroscópica dos resultados e determinou-se a CMI.

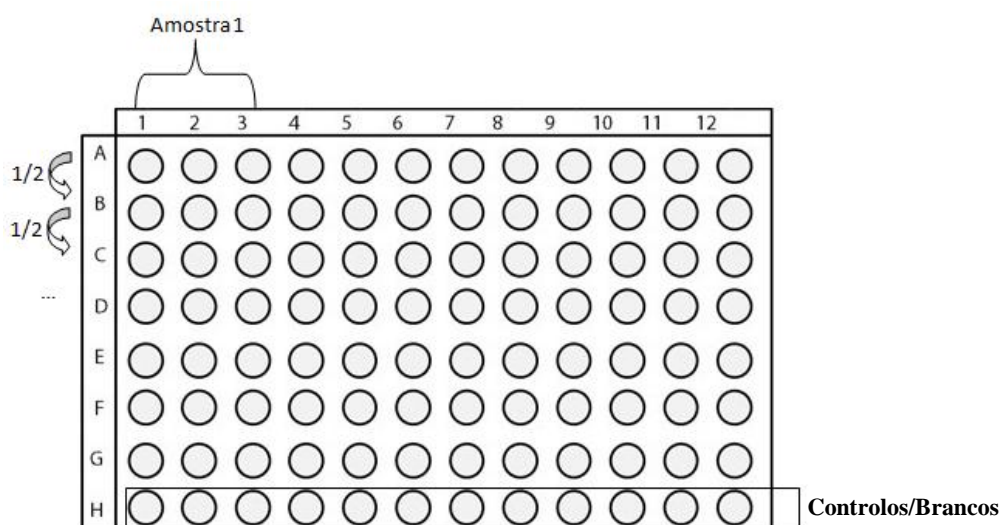


Figura 11- Demonstração da aplicação das amostras na microplaca (adaptado de Gentox, 2012).

### 3.3 Avaliação fitoquímica dos extratos vegetais

Utilizando a técnica de TLC descrita no capítulo 3.2.1.1 os extratos vegetais e respetivas frações foram colocados em placas onde ocorreu a separação dos componentes dos extratos, de acordo com as suas polaridades. Os ensaios foram feitos em triplicado para cada solvente de extração (metanol, clorofórmio e etil acetato). Após a corrida de todas as amostras estas foram fotografadas em modo normal e sob luz UV, tendo sido assim possível diferenciar alguns dos componentes que compunham cada amostra. Após captura fotográfica, as placas foram agrupadas por tipo de solvente de extração das amostras, formando três grupos, cada um com três placas. Cada uma destas foi pulverizada com um reagente diferente, que causou alterações de cor de acordo com os fitoquímicos existentes no extrato da planta (Quach *et al.*, 2004; Gurib-Fakim, 2005; Sasidharan *et al.*, 2011). Os reagentes utilizados foram o Folin-Ciocalteu (para reação com os fenóis, a 1/10), o 4-(Dimetilamino)benzaldeído (para reação com os terpenos) e o Dragendorff-Munier (para reação com os alcalóides).

### 3.4 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em células animais

Este teste foi apenas realizado para os extratos que tinham sido extraídas com o solvente metanol. Foram utilizadas as seguintes linhas celulares: Vero (oferta do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária - LNIV), 3T3 (oferta do AIDS Reagent, USA) (não tumorais), HeLa (oferta do AIDS Reagent, USA) e Hep-2 (oferta da Doutora Dinora Lopes) (tumorais) para testar os extratos vegetais de todas as amostras e todos os solventes. Foram colocados 100 µl de células numa concentração de  $2 \times 10^5$ /ml por poço, em meio *Dulbecco's Modified Eagles* (DME) com 10% de soro fetal, em placas para cultura de células de 96 poços. As placas foram a incubar a 37°C durante 24h (em atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub>). Após esta incubação, foi adicionado aos poços mais 80 µl de meio DME com 10% soro e 20 µl dos extratos, numa concentração de 1 mg/ml. Todo este protocolo foi feito em triplicado para cada extrato. Foi guardada uma fila de poços que foi dividida em duas partes, em 2 poços foram colocados os controlos negativos, em que apenas constavam as células em meio, e nos outros 4 poços foi adicionado apenas meio, que serviria de “branco” para o método. As placas foram novamente a incubar em atmosfera controlada durante 72 horas, findo esse período foi-lhes removido o meio de cultura e os poços foram lavados uma vez com 200µl de tampão fosfato-salino (PBS). Prosseguiu-se depois com o protocolo de MTT para testar a proliferação celular. Foi preparada uma solução *stock* de MTT, na concentração de 5 mg/ml em PBS, tendo sido a solução filtrada de seguida através de um filtro de 0.2 µm. Foi posteriormente feita uma diluição de 1 para 10 em PBS, sendo essa a solução de trabalho utilizada, e que foi adicionada (40 µl). Esta mistura foi a incubar a 37°C durante 3 horas, tendo sido a solução de MTT removida no final. Foi utilizada uma solução de 0.04 M HCl em isopronapol absoluto para solubilizar os cristais formados durante a reação do MTT, tendo sido pipetado 50 µl desta solução para cada poço, tendo o cuidado de misturar bem o conteúdo destes, com o auxílio da pipeta. As placas foram depois lidas no espectrofotómetro, à densidade ótica (DO) de 570 nm e 650 nm. A densidade ótica celular para cada amostra foi calculada através da fórmula:  $DO_{570nm} - DO_{650nm}$  (Lappalainen *et al.*, 1994; Khattak *et al.*, 2006).

### 3.5 Avaliação dos extratos vegetais em *Artemia salina*

Foram colocados em meio salino ovos de *A. salina* (Sera, Artemia-Mix, Heinsberg, Alemanha) a eclodir durante 24 horas, a 25°C no escuro (Bajracharya e Tuladhar, 2011). Posteriormente, *Artemia* que eclodiram foram transferidas para um meio novo de forma a remover os restantes ovos. Utilizou-se microplacas de 96 poços de fundo plano e na primeira linha das placas colocaram-se as amostras em concentração de 1 mg/ml e em duplicado. Foram pipetados 100 µl do meio salino por poço e 200 µl na primeira linha de cada placa. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, para cada poço foram pipetadas 1 a 2 gotas do meio contendo *Artemia*, cada gota continha entre 8 a 15 crustáceos. Também se usou DMSO como controlo positivo em duplicado. Foram feitas diluições seriadas de 1 para 2 nos poços subsequentes. Na última linha da placa foi utilizado HCl puro diluído de 1 para 2, como controlo negativo. As placas foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz durante 24 horas, findo esse tempo, em cada poço procedeu-se a uma contagem do número de *Artemia* mortas. Após esta contagem foi pipetado para cada poço, uma gota de HCl puro e após 15 minutos foi feita uma nova contagem das *Artemia* mortas, que correspondiam ao total de *Artemia* existentes por poço (figura 12).



Figura 12 – *Artemia salina* em poço de fundo plano

Foi determinada a LC50 para cada extrato através da diferença entre as *Artemia* que existiam no poço e as que morreram aquando a adição do extrato vegetal.

### 3.6 Avaliação dos extratos vegetais em *Toxoplasma gondii*

Para a realização deste teste foi utilizado *T. gondii* da estirpe RH (oferta do AIDS Reagent, USA), partindo do princípio que *T. gondii* é viável em cultura, fora das células animais até 24 horas (Carvalho e Farhat, 1999). Este parasita foi cultivado em células Vero em meio DME com 0.2% de soro fetal, purificado em Percoll a 40%, após centrifugação a 2000G durante 10 minutos. O parasita foi recolhido do Percoll e centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos e lavado três vezes em PBS (Jones-Brando *et al.*, 2003). Foi medida a concentração celular com o hemocítmetro e diluído em meio DME sem vermelho de fenol com 1% soro fetal, para  $3,4 \times 10^4$  células/ml. Foram colocados 100 µl de células, na concentração indicada, em placas de 96 poços e de seguida foi adicionado 100 µl de extrato vegetal (na concentração de 1 mg/ml). Apenas a primeira linha de cada placa continha 200 µl de células para permitir fazer uma diluição do extrato vegetal para  $\frac{1}{2}$  nos poços subsequentes. Foram utilizados quatro poços para controlo, contendo apenas meio de cultura. De seguida a mistura foi a incubar durante 4 horas a 37°C. Foi feita uma solução de 5 mg/ml sal de tetrazólio (XTT) com 1 mg/ml de metossulfato de fenazina (PMS), e findo o tempo de incubação aos poços foi adicionado 25µl do corante XTT/PMS. Este corante com o tempo de incubação vai formando um corante alaranjado e a sua intensidade é proporcional ao número de células metabolicamente ativas em cada poço. Passado 1h30m de incubação das placas a 37°C, foi feita uma leitura destas a 490 nm. Foi feita outra leitura das placas a 650 nm (ATCC, 2011). A diferença de absorvâncias obtidas foi diretamente proporcional ao número de células viáveis por poço. Os valores das absorvâncias obtidas nos poços com extratos e nos poços sem extratos foram usados para determinar a percentagem de viabilidade celular.

### 3.7 Avaliação dos extratos vegetais quanto à sua composição em polifenóis

A reta de calibração para este teste foi feita utilizando uma solução de trabalho do reagente Folin-Ciocalciu diluído de 1/10 em água Milli-Q, uma solução de propilo galato na concentração de 3mg/ml em etanol, e carbonato de sódio a 75g/l. Como

mostra a tabela III, foram misturadas as soluções, iniciando o processo com a solução de propilo galato. Houve uma incubação de 30 minutos e no final as microplacas foram medidas espectrofotometricamente a 765 nm (Folin e Ciocalteu, 1927; Miliauskas *et al.*, 2004). A reta de calibração foi assim traçada, e encontrada em mg/g equivalentes a propilo galato a concentração em polifenóis das amostras.

A quantificação de polifenóis nos extratos vegetais foi feita recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu. Em microplacas de 96 poços foram colocados 20 µl dos extratos numa concentração inicial de 1mg/ml, contudo estes foram diluídos a 1/5. Às diluições dos extratos foram adicionados 100 µl de reagente Folin-Ciocalteu (2,0 M) e misturou-se. As amostras foram processadas em triplicado. Após 5 minutos, adicionou-se 100 µl de carbonato de sódio (75g/l) e as microplacas foram deixadas 2 horas à temperatura ambiente. Cada amostra continha um controlo (180µl de água destilada, mais 20 µl do extrato) e o branco da reação continha 200 µl de água destilada. Foram também guardados três poços para servirem de branco da amostra, contendo todos os reagentes (Carbonato e Folin-Ciocalteu) à exceção de amostra (Zhang *et al.*, 2006). No final foi medida a absorvância das placas espectrofotometricamente a 750 nm.

Tabela III – Soluções utilizadas para traçar reta de calibração, para determinação de compostos fenólicos

Reta Calibração (mg/ml de propilo galato)	Solução de propilo galato (µl)	Folin-Ciocalteu 1:10 (µl)	Carbonato de Sódio (µl)
0.60	20	100	80
0.30	20	100	80
0.15	20	100	80
0.0075	20	100	80
0.0375	20	100	80
0.01875	20	100	80
0	20 (só de etanol)	100	80

Para as amostras em que as absorvâncias obtidas não se encontravam dentro da reta de calibração foram feitos novos testes, com os extratos diluídos a 1/50 para se obterem resultados que se inseriam na reta.

### 3.8 Avaliação dos extratos vegetais quanto à atividade do óxido nítrico

Esta avaliação foi feita de acordo com o método descrito em 2010 por Ho *et al.*. As amostras foram processadas em triplicado. Foram adicionados 50 µl de amostra (extrato diluído 1/5 em água Milli-Q) a 50 µl de 10 mM de SNP em microplacas devidamente identificadas. A mistura incubou à temperatura ambiente durante 90 minutos. Findo esse período, um volume igual de reagente de Griess e as placas foram imediatamente lidas espectrofotometricamente a 546nm. Foram utilizados poços como brancos que continham SNP e reagente de Griess e outros poços controlo que continham apenas amostra e SNP. Foi utilizado ácido ascórbico para traçar a reta de calibração. A concentração inicial foi de 1mg/ml e foram feitas diluições de 1/2 até alcançar a concentração de 0.008mg/ml, conseguindo-se a reta de calibração. A avaliação da atividade do óxido nítrico foi feita recolhendo as absorvâncias lidas espectrofotometricamente e aplicando a fórmula:

$$\% \text{ atividade} = \frac{\text{absorvância do controlo} - \text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do controlo}} \times 100$$

### 3.9 Avaliação dos extratos vegetais quanto à atividade antioxidante (ABTS)

Foram pesadas 10 mg de ABTS com 1.7 mg de persulfato de potássio, em 2.5 ml de água destilada. Esta solução *stock* foi mantida no escuro durante 12 a 16 horas. Findo este tempo queríamos obter uma solução de ABTS com DO entre os 0.7 e 1.0 a 734 nm. Para tal fizemos sete soluções diferentes de ABTS com 200 µl de etanol, em triplicado. Os volumes de *stock* utilizados para as sete soluções foram 2.8; 2.9; 3.0; 3.1; 3.2; 3.3 e 3.4 µl e feitas as diferentes soluções (incluindo os triplicados), as suas DO foram medidas a 734 nm. Foi escolhida então a solução com DO dentro do intervalo (neste caso 3.4 µl de *stock* com 200 µl de etanol) (Re *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2009; Mayur *et al.*, 2010).

A reta de calibração foi realizada com ácido ascórbico nas concentrações de 0, 4, 7, 11, 14, 17, 20, 23 e 26 µg/ml. A estas concentrações de ácido eram adicionados 10 µl de etanol e 200 µl de solução de trabalho, tendo estas placas sofrido a mesma incubação de 6 minutos e 30°C e sido imediatamente lidas a 734 nm. A percentagem da atividade de redução foi depois calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ atividade de redução} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do controlo}} \right) \right] \times 100$$

Foram adicionados em triplicado a microplacas de 96 poços os extratos vegetais, na concentração de 1 mg/ml num volume de 10 µl. A cada poço foi adicionado 200 µl de solução de trabalho do ABTS, tendo as placas sido ligeiramente agitadas e incubadas a 30°C durante seis minutos. Alguns poços foram guardados para servirem de controlo positivo, onde ao invés dos extratos, constavam 10 µl de etanol. Após o período de incubação, as placas foram imediatamente lidas a 734 nm.

### **3.10 Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos vegetais na reparação de ADN**

Para este ensaio foi usado o plasmídeo pUC18 que foi inserido em *E. coli*. A transformação bacteriana foi feita com o método do cloreto de cálcio (Ausubel *et al.*, 1992). A cultura foi semeada em meio LB sólido com ampicilina (50µg/ml) e incubada durante a noite a 37°C. Foram selecionadas três colónias para um tubo cónico que continha 50 ml de meio LB líquido. Incubou-se durante 24 horas o meio contendo as bactérias com o plasmídeo, e prosseguiu-se à extração do ADN do plasmídeo.

Para o isolamento do plasmídeo, seguiu-se o procedimento do Mini-Prep (Sambrook *et al.*, 1989), tendo a suspensão de células sido centrifugada a 6000G durante 10 minutos e sido removido o meio de cultura. Ressuspendeu-se o preparado de células com 5 ml de tampão TEG (100 mM Tris-HCl a pH=8, 2mM EDTA e 20% glucose) e juntou-se 50 µl de RNAase (1 mg/ml), foi a incubar durante 5 minutos. Foram adicionados 10 ml de solução salina normal (0.2 M NaOH, 1% SDS) e misturou-se as soluções gentilmente por inversão do tudo seis a oito vezes. A suspensão incubou

à temperatura ambiente durante dois a três minutos e juntou-se 7.5 ml de uma solução de 3 M de acetato de sódio (pH=5.3), misturando novamente através de inversão gentil do tubo, seis a oito vezes. A suspensão foi a incubar em gelo durante 5 minutos e centrifugada de seguida a 9000G a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em papel de filtro, tendo sido posteriormente adicionado isopropanol, tendo a mistura ficado a incubar a 4°C durante 18h. Centrifugou-se a 9000G durante 20 minutos para descartar o sobrenadante e lavou-se o preparado de células com etanol a 70% e se seguida com etanol a 100%. O ADN foi depois purificado em coluna de sílica, tendo no final sido lavado uma vez com álcool a 70% e outra vez com álcool a 100% e após completa secagem o ADN do plasmídeo foi ressuspenso em tampão TE (Ausubel *et al.*, 1992). Determinou-se a concentração do ADN após leitura a 260 e 280 nm.

Foram realizados vários ensaios para otimizar o método do reagente de Fenton e a sua capacidade antioxidante dos extratos (Lee *et al.* 2002). Todas as misturas continham 1 µl de ADN, 2 µl de água destilada e 3 µl do reagente de Fenton a testar. Os reagentes testados estão apresentados na tabela IV, numerados de 1 a 8, e apresentam-se também os controlos realizados para a reação, de C1 a C3:

**Tabela IV - Soluções testadas para obtenção do reagente de Fenton ideal**

	C1	C2	C3	1	2	3	4	5	6	7	8
FeCl <sub>3</sub>	-	2 µl	-	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Cisteína	-	-	2 µl	-	-	-	-	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl
NaHCO <sub>3</sub>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

A 5µl de cada amostra foi adicionado 2 µl de corante *loading dye* e após corrida em gel de agarose a 1% (ao qual havia sido incorporado brometo de etídio [5µl em 200ml de gel] durante a sua preparação) em tampão TAE (40mM tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8.0), durante 30 a 45 minutos a 1-5 V/cm, o gel foi observado utilizando a luz UV do transiluminador e foram tirados registos fotográficos dos resultados.

Além do reagente de Fenton era necessário determinar qual a quantidade de ácido ascórbico a utilizar na reação final. Foi feita uma solução de 100mM de ácido ascórbico, que depois foi diluída 100 vezes. Com esta solução de 1 mM, fizeram-se sete

diluições, diluindo sempre a  $\frac{1}{2}$ , estas foram utilizadas como mostra a tabela V. Na tabela VI estão representados os controlos utilizados para esta reação.

**Tabela V – Diluições utilizadas para determinação da concentração de ácido ascórbico**

	1	2	3	4	5	6	7
ADN	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Ácido Ascórbico	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Reagente Fenton	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l

**Tabela VI – Controlos utilizados para determinação da concentração de ácido ascórbico**

C1	C2	C3
2 $\mu$ l ADN	2 $\mu$ l ADN	2 $\mu$ l ADN
1 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	-
3 $\mu$ l Reagente de Fenton	3 $\mu$ l NaHCO <sub>3</sub>	3 $\mu$ l NaHCO <sub>3</sub> +FeCl <sub>3</sub>

As concentrações utilizadas foram 16 $\mu$ M; 8 $\mu$ M; 4 $\mu$ M; 2 $\mu$ M; 1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M e 0.25 $\mu$ M. Adicionou-se 2  $\mu$ l de *loading dye* a 6  $\mu$ l de cada amostra e após corrida em gel de agarose a 1% (ao qual havia sido incorporado brometo de etídio [5 $\mu$ l em 200ml de gel] durante a sua preparação) em solução TAE, durante 30 a 45 minutos a 1-5 V/cm, o gel foi lido utilizando a luz UV do transiluminador e foram tirados registos fotográficos dos resultados. A amostra com melhores resultados, foi encontrada e apurada a concentração de ácido ascórbico usada, para usar nas reações seguintes.

Foram previamente testadas duas substâncias como controlos positivos, o ácido cafeico e a morina, dois compostos antioxidantes (Ramos-Escudero *et al.*, 2012). O ácido cafeico estava numa concentração inicial de 3.6 mg/ml ao passo que a morina estava a 6 mg/ml. Para ambos foram feitas 6 diluições, diluindo sempre a 1/100. Foram colocadas separadamente em tubos de centrífuga de 1,5ml 10  $\mu$ l dessas diluições, às quais se adicionou 1  $\mu$ l do ADN do plasmídeo. A mistura incubou 10 minutos e findo esse período foi adicionado 1  $\mu$ l de ácido ascórbico (na concentração previamente encontrada) e 10  $\mu$ l do reagente de Fenton escolhido. Houve uma incubação de 30 minutos a 37°C e os 5  $\mu$ l das amostras correram em gel de agarose a 1% (ao qual havia sido incorporado brometo de etídio [5 $\mu$ l em 200ml de gel] durante a sua preparação) em solução TAE, durante 30 a 45 minutos a 1-5 V/cm. O gel foi lido e a amostra com melhores resultados para cada substância, foi encontrada para ser utilizar na reação seguinte.

A reação final envolveu o teste dos extratos vegetais. Todas as amostras dos extratos foram diluídas a 40 µg/ml e foi utilizado ácido ascórbico na concentração definida. Em tubos de centrífuga de 1,5ml, separadamente, foram colocados 10 µl de todas as diluições das amostras e também das amostras de morina e ácido cafeico nas concentrações apuradas. A essas diluições juntou-se 1µl do ADN do plasmídeo e deixou-se a mistura incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo 1 µl do ácido ascórbico foi adicionado à mistura, seguido da adição de 10 µl do reagente de Fenton escolhido. Cada tubo incubou 30 minutos a 37°C (Lee *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2010; Sekhar *et al.*, 2013). Paralelamente foram feitos alguns controlos. O controlo 1 continha apenas 5µl ADN, o controlo 2 continha 1 µl de ADN, 1 µl de água destilada e 3 µl de NaHCO<sub>3</sub> e finalmente o controlo 3 continha 1 µl de ADN, 1 µl de água destilada e 3 µl de NaHCO<sub>3</sub> com FeCl<sub>3</sub> (solução de 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> com 2 µl de FeCl<sub>3</sub>). Juntamente com todas as amostras e controlos utilizados em todas as reações foi corrido um marcador Lambda Hind III (Thermo Scientific). Utilizaram-se 2µl de corante para cada amostra de ADN e foi misturado e carregado com 5µl de cada amostra. As amostras e controlos foram corridos em gel de agarose a 1% (ao qual havia sido incorporado brometo de etídio [5µl em 200ml de gel] durante a sua preparação) em tampão TAE, durante 30 a 45 minutos a 1-5 V/cm. No final dessa corrida o gel foi lido utilizando a luz UV do transiluminador e foram tirados registos fotográficos dos resultados.

## **Capítulo IV - Resultados**

#### 4.1 Obtenção da biblioteca de extratos

Após secagem de cada planta, e depois de ter sido adicionado 4 ml de um solvente diferente (metanol, o clorofórmio e etil acetato), o processo de extração produziu, ao fim de uma incubação de 2/3 dias à temperatura ambiente em tubos vedados (figura 13), os extratos totais que constituíram a biblioteca de extratos. Os extratos das plantas foram depois transferidos para tubos de congelação de polipropileno que constituíram a biblioteca de extratos (figura 10).



**Figura 13 – Processo de extração com os solventes escolhidos**

Para fazer um fracionamento das amostras extraídas com o metanol, foi utilizada a resina Diaion HP-20. Após utilização das sete soluções para a lavagem e consequente fracionamento dos extratos, alguns exemplos constam na figura 14. Também estas sete frações de extratos, para cada amostra, foram adicionadas à biblioteca de extratos em tubos de congelação de polipropileno.

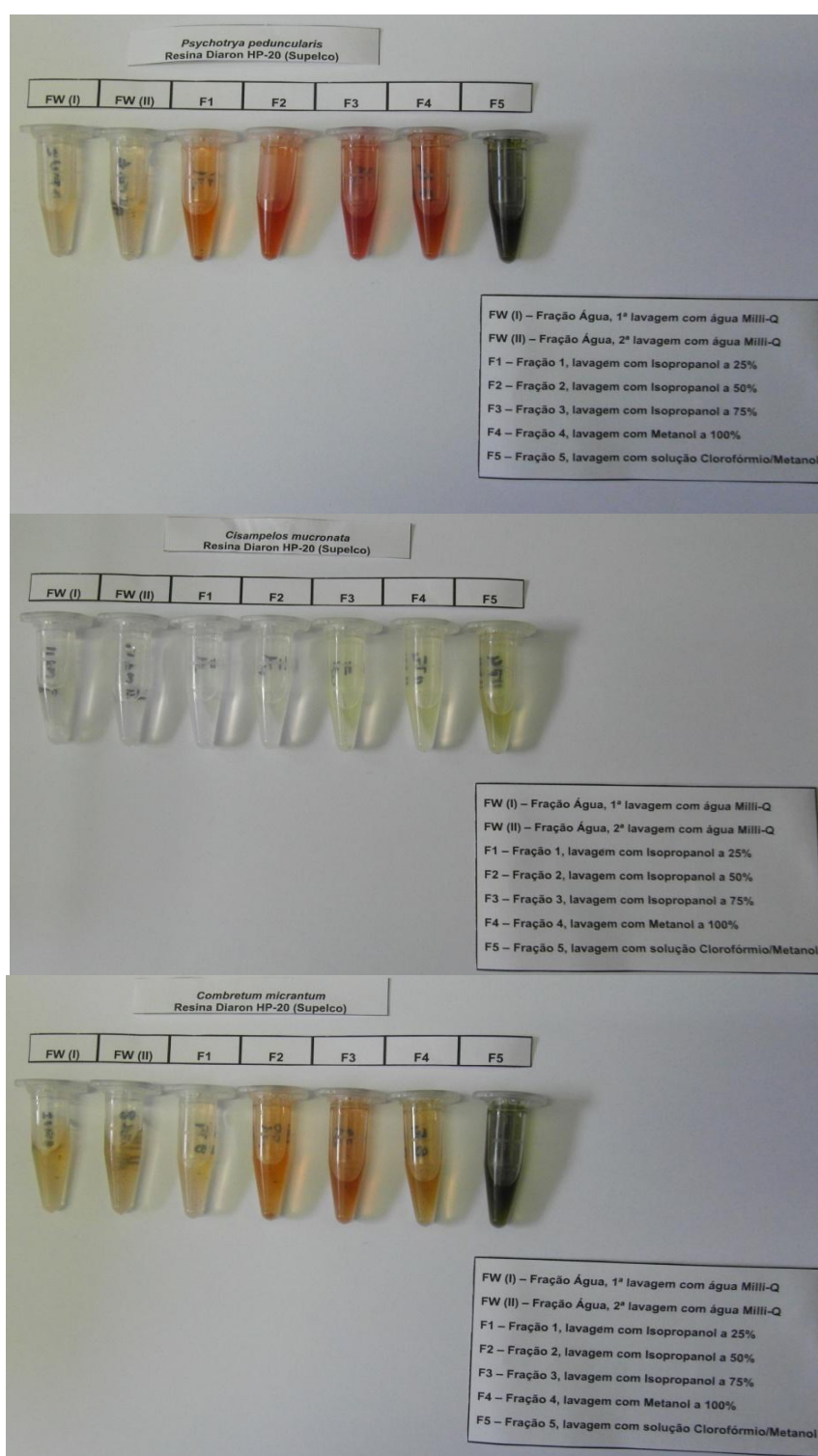


Figura 14 - Produtos das extrações obtidos após sucessivas lavagens em resina Diaion HP-20 (Supelco). Por ordem crescente: FWI (1ª lavagem com água Milli-Q), FWII (2ª lavagem com água Milli-Q), F1 (lavagem com isopropanol a 25%), F2 (lavagem com isopropanol a 50%), F3 (lavagem com isopropanol a 75%), F4 (lavagem com metanol a 100%) e F5 (lavagem com solução clorofórmio/metanol).

## 4.2 Análise dos ensaios qualitativos dos extratos vegetais em bactérias

Os ensaios qualitativos para avaliação da atividade antibacteriana foram em meio sólido e líquido. Relativamente ao meio sólido (meio de Mueller-Hinton) foram feitos os ensaios para os extratos vegetais que utilizaram como solventes de extração o metanol, clorofórmio e etil acetato mas também para as frações da resina Diaion HP-20 dos extratos que haviam usado metanol para a extração. Nas figuras 15, 16 e 17 é possível ver alguns exemplos dos resultados obtidos quanto à apresentação ou não de halos por ação antibacteriana em meio sólido.

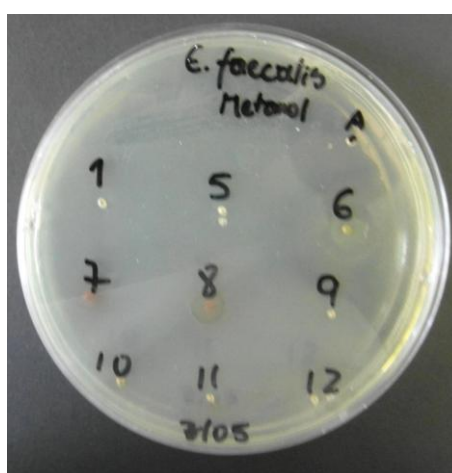


Figura 15 - Halos de inibição da placa inoculada com *E. faecalis*. Os extratos testados tinham sido extraídos com metanol. Amostras 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 de acordo com a tabela II. Controlo utilizado (A): 1µl ampicilina (50mg/ml).



Figura 16 - Halos de inibição da placa inoculada com *S. aureus*. Os extratos testados tinham sido extraídos com clorofórmio. Amostras 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 de acordo com a tabela II. Controlo utilizado (A): 1µl ampicilina (50mg/ml).



Figura 17 - Halos de inibição da placa inoculada com *S. aureus*. Os extratos testados tinham sido extraídos com etil acetato. Amostras 24, 25, 26, 27, 34 e 35 de acordo com a tabela II. Controle utilizado (A): 1µl ampicilina (50mg/ml).

Nos gráficos 1 a 21 figuram o diâmetro dos halos obtidos para os extratos totais e para as frações com a resina Diaidon HP-20, onde para cada planta e tipo de bactérias, se mostra os halos obtidos e o seu tamanho, em meio sólido. As siglas FWI (1ª lavagem com água Milli-Q), FWII (2ª lavagem com água Milli-Q), F1 (lavagem com isopropanol a 25%), F2 (lavagem com isopropanol a 50%), F3 (lavagem com isopropanol a 75%), F4 (lavagem com metanol a 100%) e F5 (lavagem com solução clorofórmio/metanol) são utilizadas para demonstrar os resultados das 7 frações para cada planta.

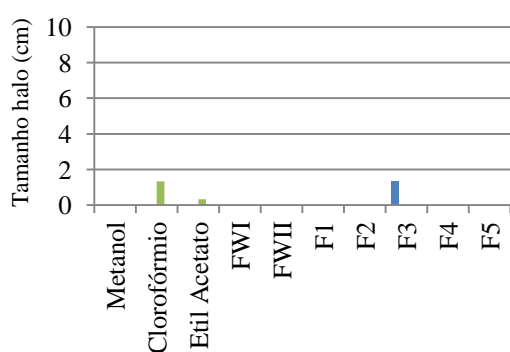


Gráfico 1- Diâmetro dos halos obtidos para *Ficus polita* (Amostra 1)

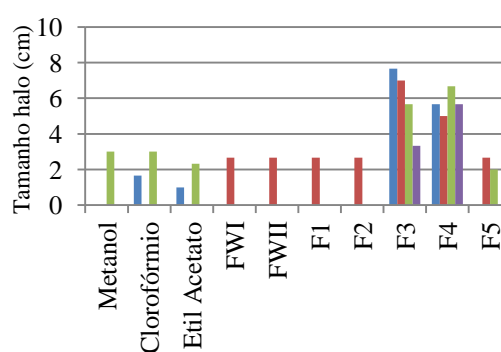


Gráfico 2 - Diâmetro dos halos obtidos para *Trichilia prieuriana prieiruana* (Amostra 5)

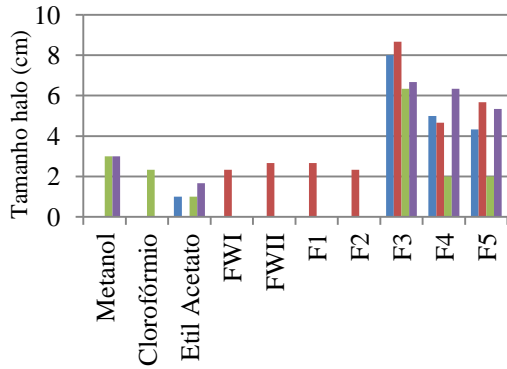


Gráfico 3 - Diâmetro dos halos obtidos para *Margaritaria discoidea* (Amostra 6)

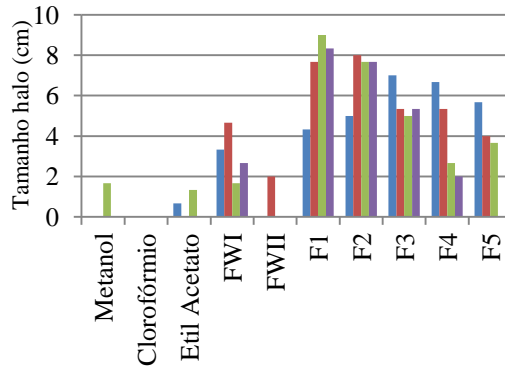


Gráfico 4 - Diâmetro dos halos obtidos para *Psychotrya peduncularis* (Amostra 7)

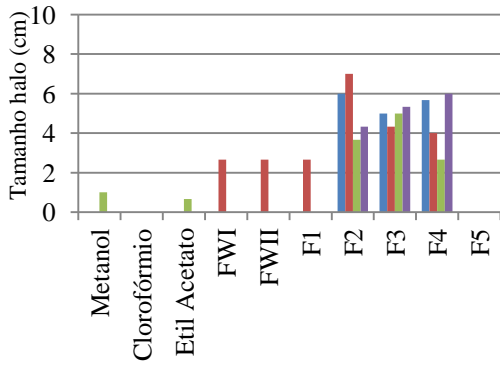


Gráfico 5 - Diâmetro dos halos obtidos para *Combretum micrantum* (Amostra 8)

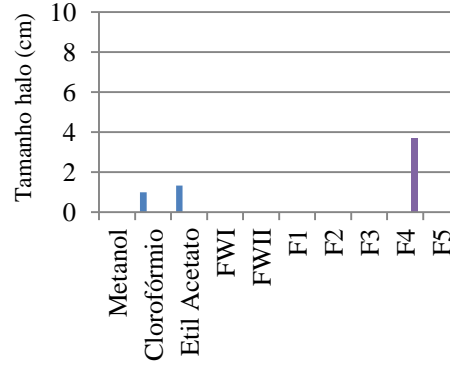


Gráfico 6 - Diâmetro dos halos obtidos para *Zanthoxylum leprieuri* (Amostra 9)

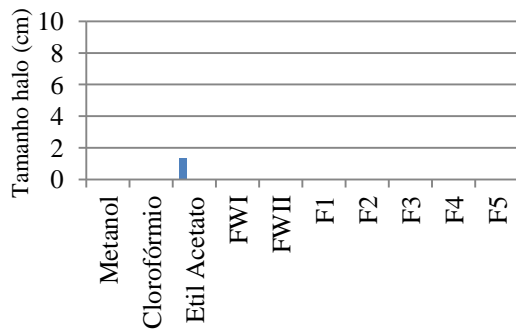


Gráfico 7 - Diâmetro dos halos obtidos para *Cassytha filiformis* (Amostra 10)

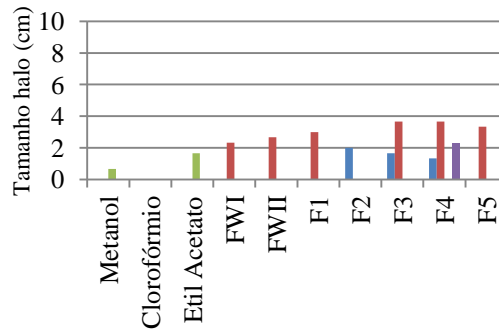


Gráfico 8 - Diâmetro dos halos obtidos para *Cisampelos mucronata* (Amostra 11)

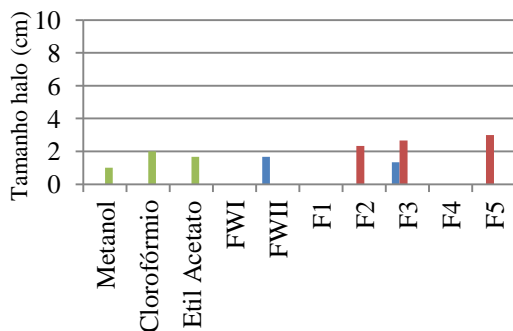


Gráfico 9 - Diâmetro dos halos obtidos para *Capparis erythrocarpus* (Amostra 12)

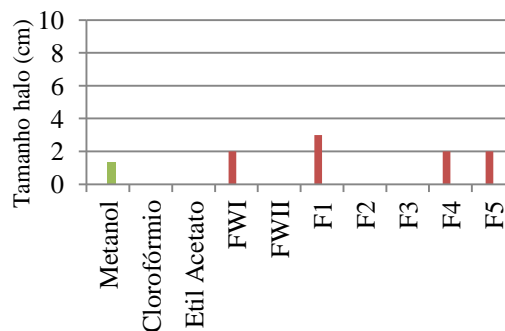


Gráfico 10 - Diâmetro dos halos obtidos para *Strophantus sarmentosus* (Amostra 13)

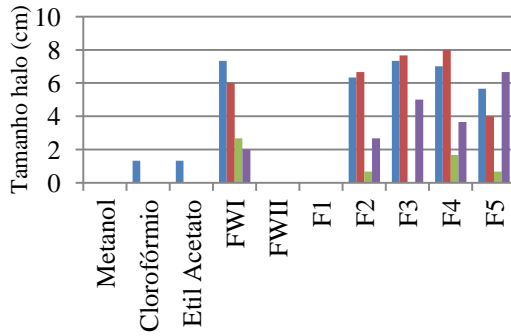


Gráfico 11 - Diâmetro dos halos obtidos para *Ocimum gratissimum* (Amostra 15)

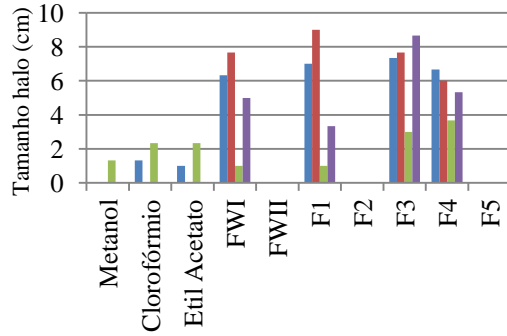


Gráfico 12 - Diâmetro dos halos obtidos para *Ocimum basilicum* (Amostra 16)

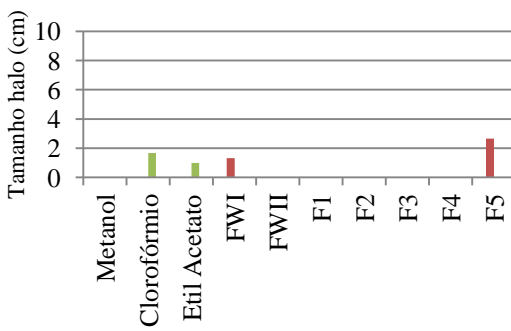


Gráfico 13 - Diâmetro dos halos obtidos para *Abrus precatorius* (Amostra 17)

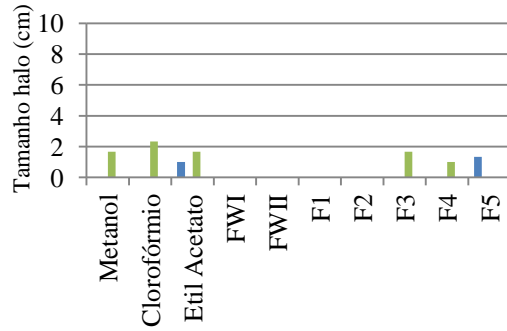


Gráfico 14 - Diâmetro dos halos obtidos para *Khaya senegalensis* (Amostra 22)

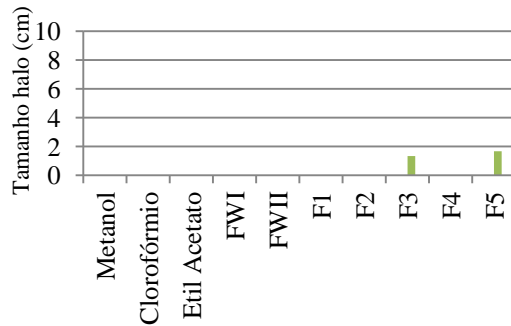


Gráfico 15 - Diâmetro dos halos obtidos para *Faidherbia álvida* (Amostra 23)

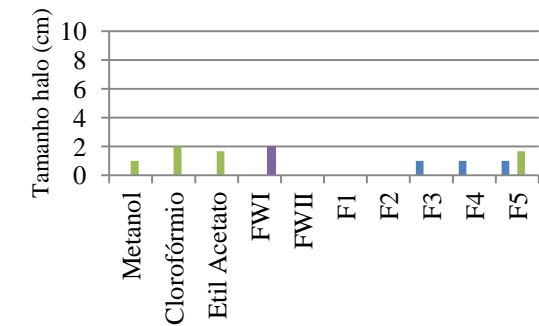


Gráfico 16 - Diâmetro dos halos obtidos para *Cnestis ferruginea* (Amostra 24)

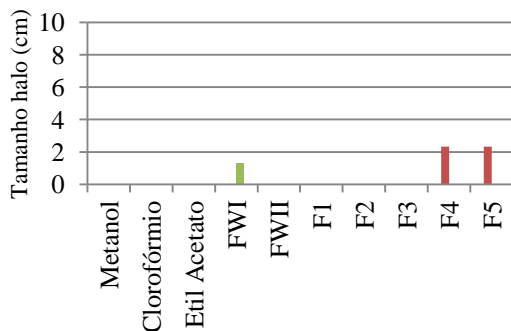


Gráfico 17 - Diâmetro dos halos obtidos para *Landolphia dulcis* (Amostra 25)

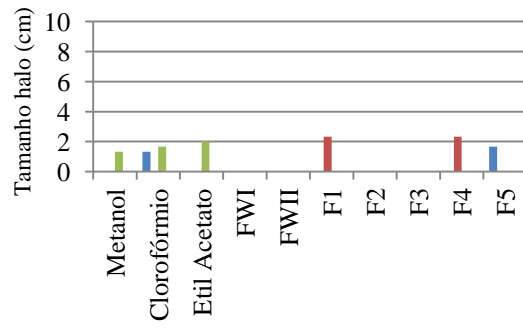


Gráfico 18 - Diâmetro dos halos obtidos para *Allophylus africanus* (Amostra 26)

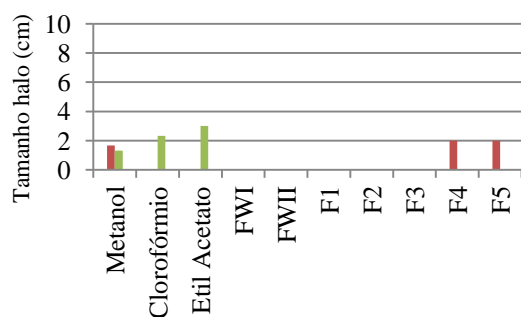


Gráfico 19 - Diâmetro dos halos obtidos para *Hymenocardia acida* (Amostra 27)

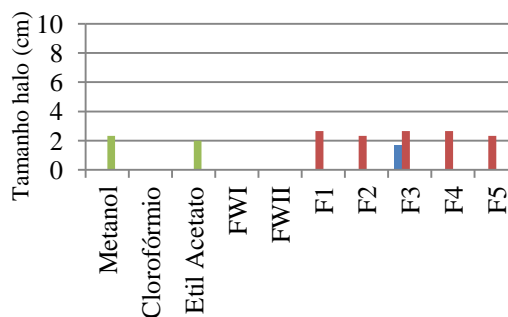


Gráfico 20 - Diâmetro dos halos obtidos para *Leptadenia hastata* (Amostra 34)

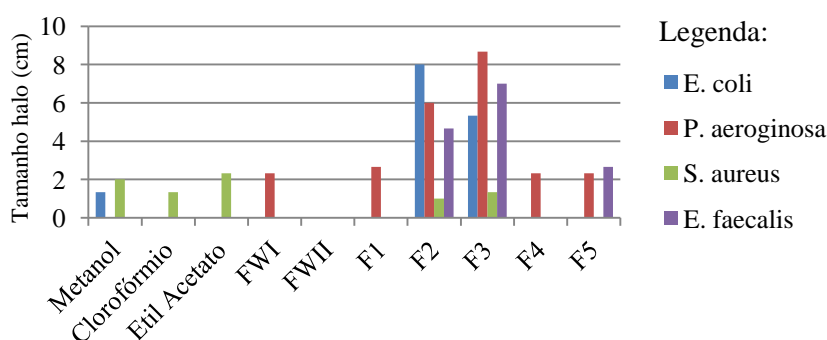


Gráfico 21 - Diâmetro dos halos obtidos para *Calyptrochilum christyanum* (Amostra 35)

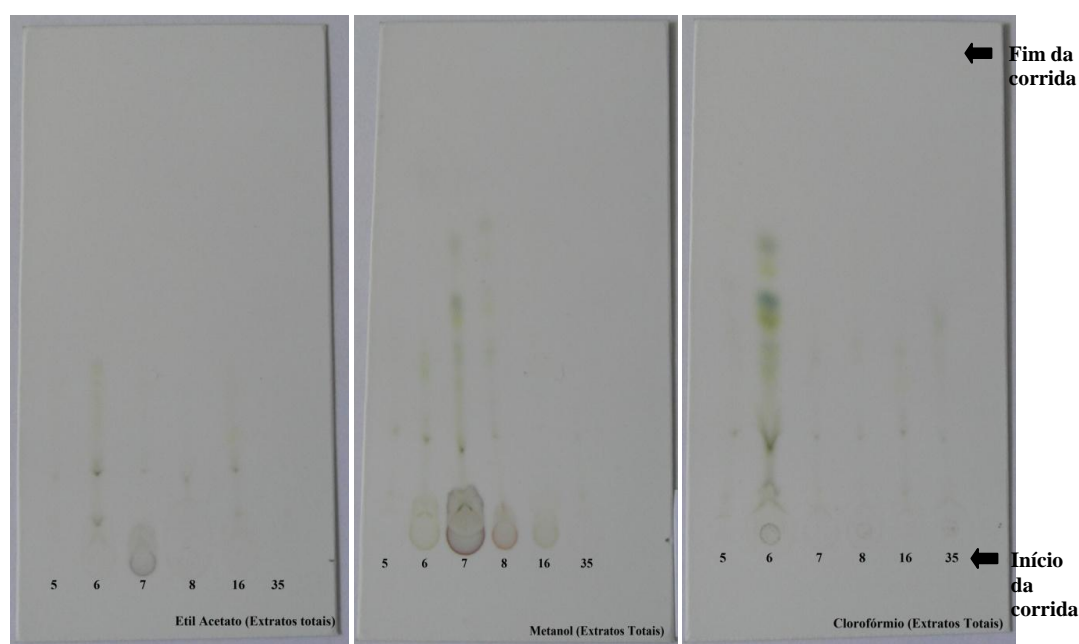
### 4.3 Determinação da CMI para *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*

Em meio líquido, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* não houve qualquer inibição bacteriana em qualquer das concentrações testadas. Houve inibição do crescimento de *P. aeruginosa* para a concentração de 0.5 mg/ml, nos extratos 9, 10 e 35 extraídos com metanol, sendo que relativamente aos restantes também não se observou qualquer atividade antibacteriana. Em *E. faecalis*, também para uma concentração de 0.5 mg/ml, houve atividade inibidora para as amostras 6, 7, 8, 13, 23 e 27 extraídas com metanol. Todos estes resultados foram visualizados macroscopicamente. Nos poços controlo com antibiótico não houve crescimento bacteriano, nem naqueles que não houve inoculação (controlo negativo).

## 4.4 Resultados obtidos por TLC

### 4.4.1 Observação macroscópica dos resultados para os extratos totais e frações de extratos por metanol

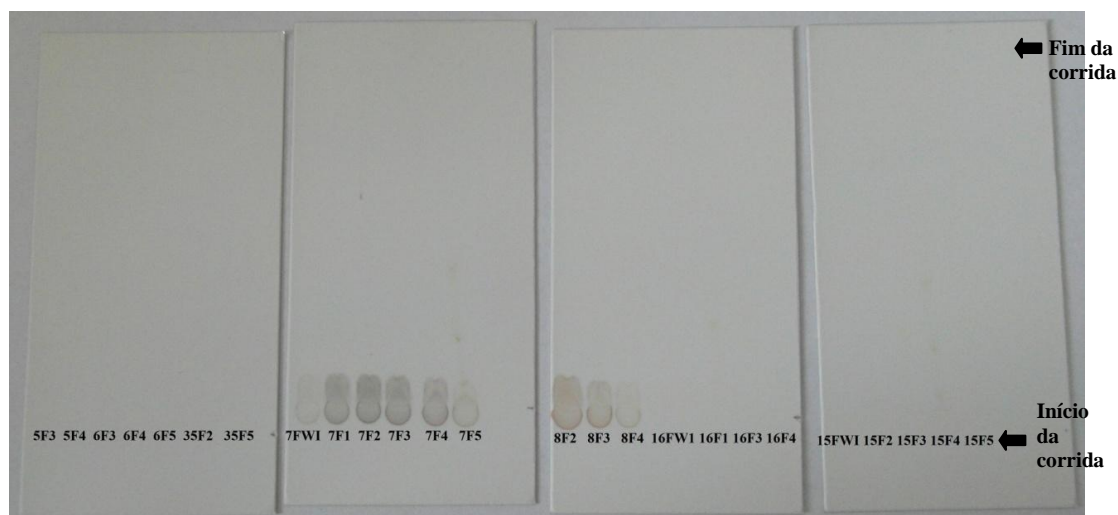
Após análise dos halos obtidos nos gráficos 1 a 21, foram escolhidas 6 das amostras totais para prosseguir para a técnica de TLC (Anexo B). As amostras escolhidas foram a 5, 6, 7, 8, 16 e 35 por serem aquelas que no teste dos halos apresentavam inibições mais amplas para mais do que uma espécie de bactérias, correspondendo respetivamente às plantas *Trichilia prieuriana prieuriana*, *Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum*, *Ocimum basilicum* e *Calyptrorchilum christyanum*. Para as amostras escolhidas, a técnica de TLC foi aplicada para os três solventes (metanol, clorofórmio e etil acetato). Depois de corridas as amostras, os resultados obtidos estão representados na figura 18.



**Figura 18-** Resultados obtidos pela técnica de TLC para os extrato totais 5, 6, 7, 8, 16 e 35. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.

Em relação às frações dos extratos por metanol e após análises dos halos obtidos expressos nos gráficos de 1 a 21, foram escolhidas 25 dessas frações para aplicar a

técnica de TLC por serem aquelas que mais fortemente inibiam as bactérias. As amostras escolhidas foram a 5F3 (Amostra 5, fração 3), 5F4, 6F3, 6F4, 6F5, 7FWI, 7F1, 7F2, 7F3, 7F4, 7F5, 8F2, 8F3, 8F4, 15FWI, 15F2, 15F3, 15F4, 15F5, 16FWI, 16F1, 16F3, 16F4, 35F2 e 35F5. Depois de corridas as amostras, os resultados obtidos estão representados na figura 19.



**Figura 19 - Resultados obtidos pela técnica de TLC para as frações das amostras selecionadas. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.**

#### **4.4.2 Observação através de UV dos resultados para os extratos totais e frações de extratos por metanol**

Para os extratos vegetais totais que testámos por TLC, os resultados da exposição a luz UV constam na figura 20.

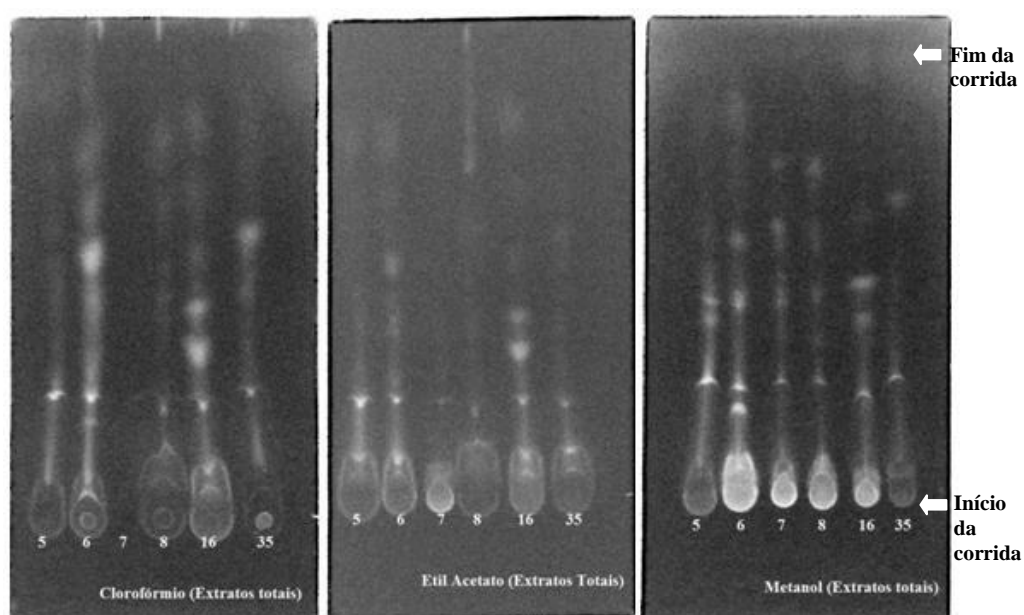


Figura 20 – Resultados da exposição a luz UV dos extratos vegetais testados por TLC. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.

Quanto às frações de extratos por metanol que mais haviam demonstrado atividade antibacteriana, após TLC os resultados obtidos por exposição a luz UV aparecem na figura 21.

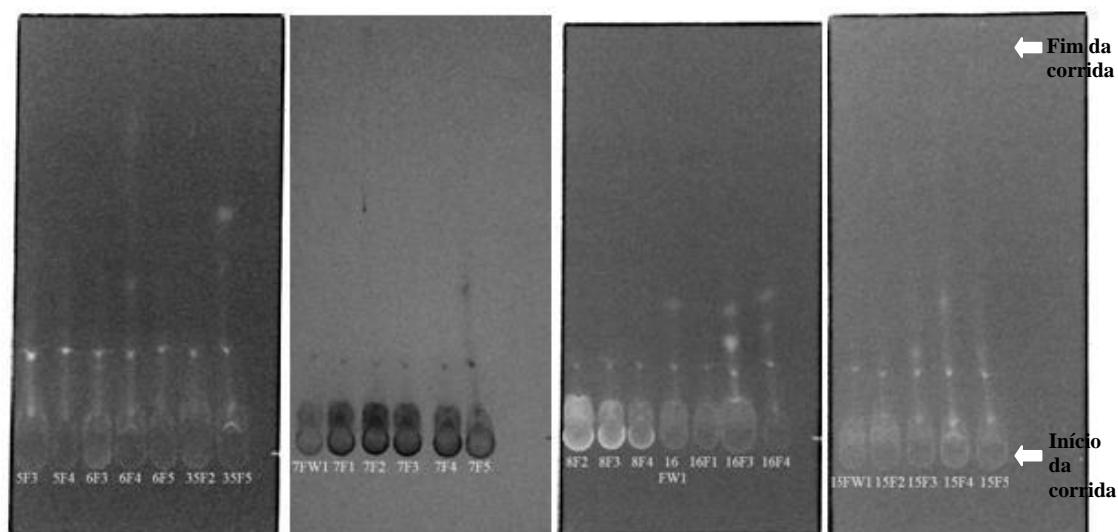
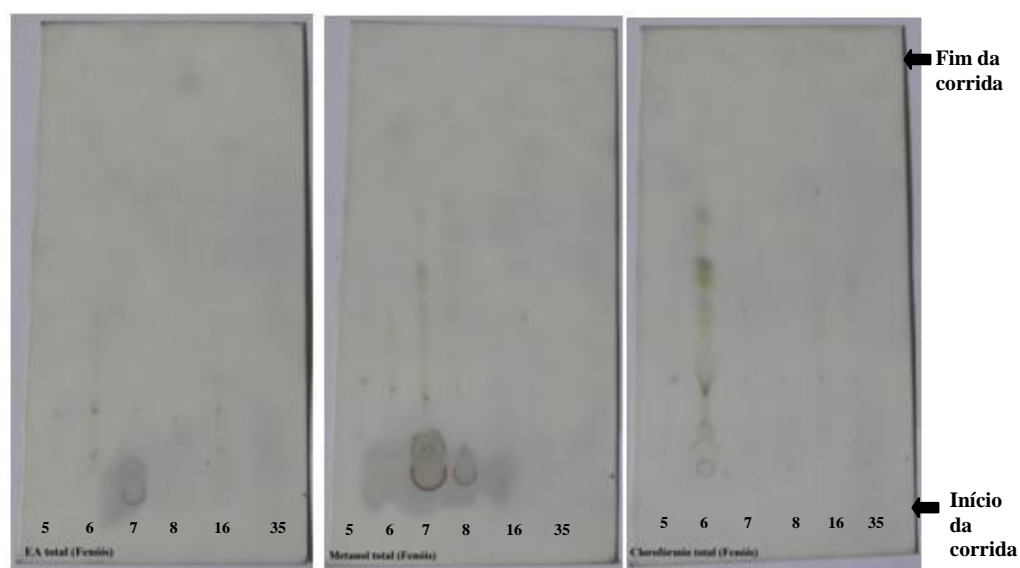


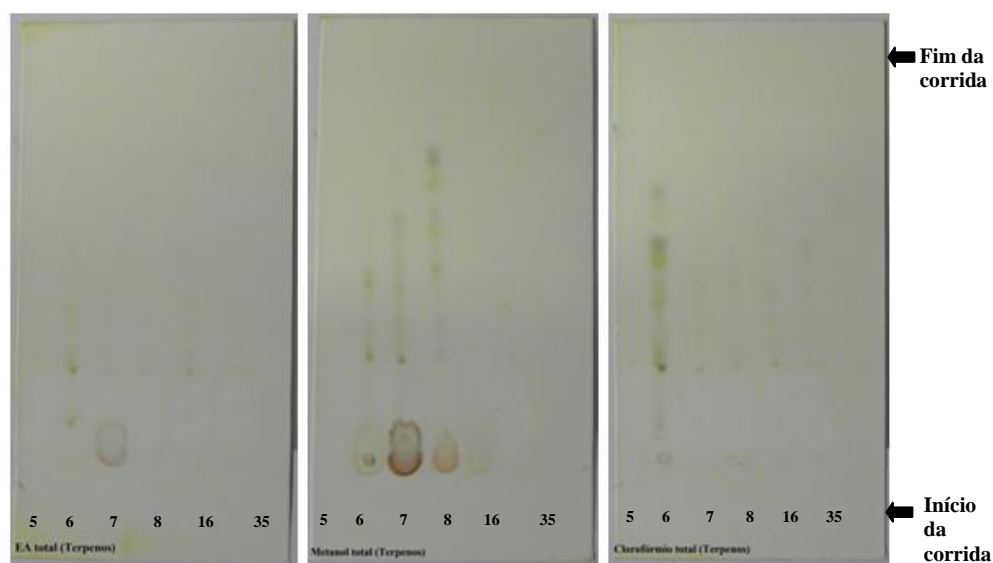
Figura 21 - Resultados da técnica de TLC das frações de extratos que mais haviam demonstrado atividade antibacteriana, obtidos por exposição a luz UV. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.

#### 4.4.3 Testes químicos realizados para os extratos totais

Como cada placa havia sido feita em triplicado para cada solvente, cada grupo de 3 placas foi pulverizado com um reagente diferente, que causou alterações de cor de acordo com os fitoquímicos existentes no extrato da planta. Os reagentes utilizados foram o Folin-Ciocalteu para reação com fenóis, 4-(Dimetilamino)benzaldeído para reação com terpenos e o Dragendorff-Munier para reação com os alcalóides. Os resultados obtidos estão nas figuras 22, 23 e 24.



**Figura 22 - Resultados após pulverização com reagente de Folin-Ciocalteu para reação com fenóis. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.**



**Figura 23- Resultados após pulverização com reagente 4-(Dimetilamino)benzaldeído para reação com terpenos. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina**

de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.

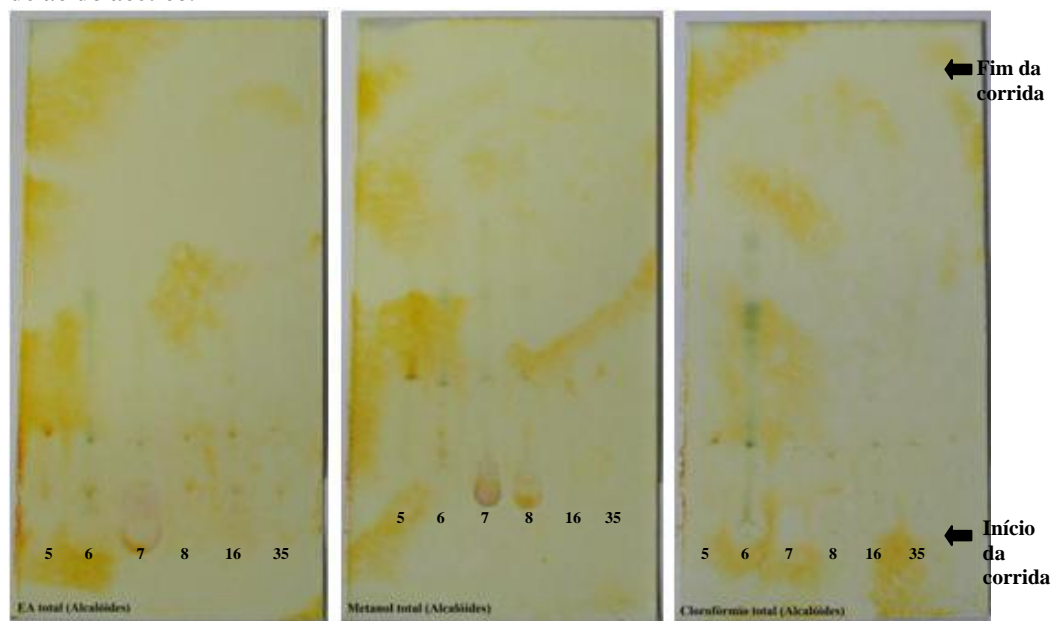


Figura 24 - Resultados após pulverização com reagente Dragendorff-Munier para reação com alcalóides. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.

Nas figuras 22 e 24 é possível verificar algumas manchas provocada pelas pulverizações dos reagentes. Na figura 22 vemos que os fenóis estão logo na parte inicial dos componentes separados, enquanto que na figura 24 a distribuição dos alcalóides já é mais ampla.

#### 4.4.4 Inibição bacteriana nas placas de TLC dos extratos totais

As placas foram preparadas em triplicado para cada solvente, de modo a inocular com as bactérias *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Após incubação das placas de acordo com o método apresentado por Valgas *et al.* (2007), em termos de coloração pelo método do INT, para *E. coli* e *E. faecalis* não houve diferenças de coloração nas placas, tendo sido obtido placas de um rosa homogéneo. Já para as restantes duas bactérias os resultados obtidos estão representados nas figuras 25 e 26 de acordo com a bactéria semeada.

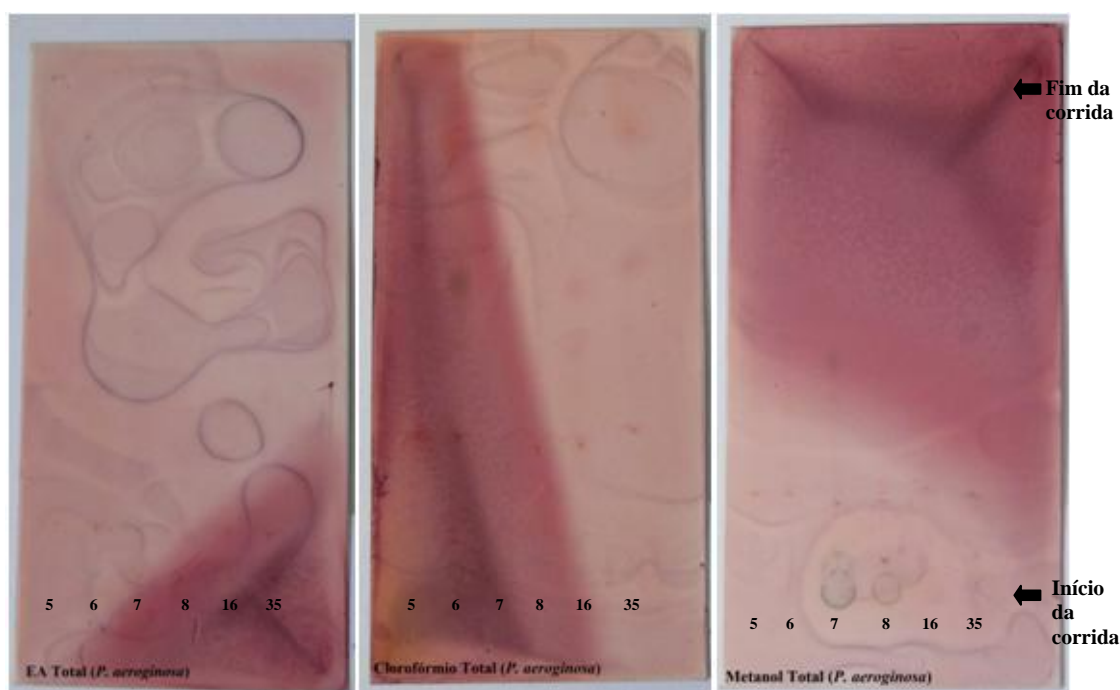


Figura 25 – Coloração adquirida pelas placas semeadas com *Pseudomonas aeruginosa* após realização da técnica do MTT. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.

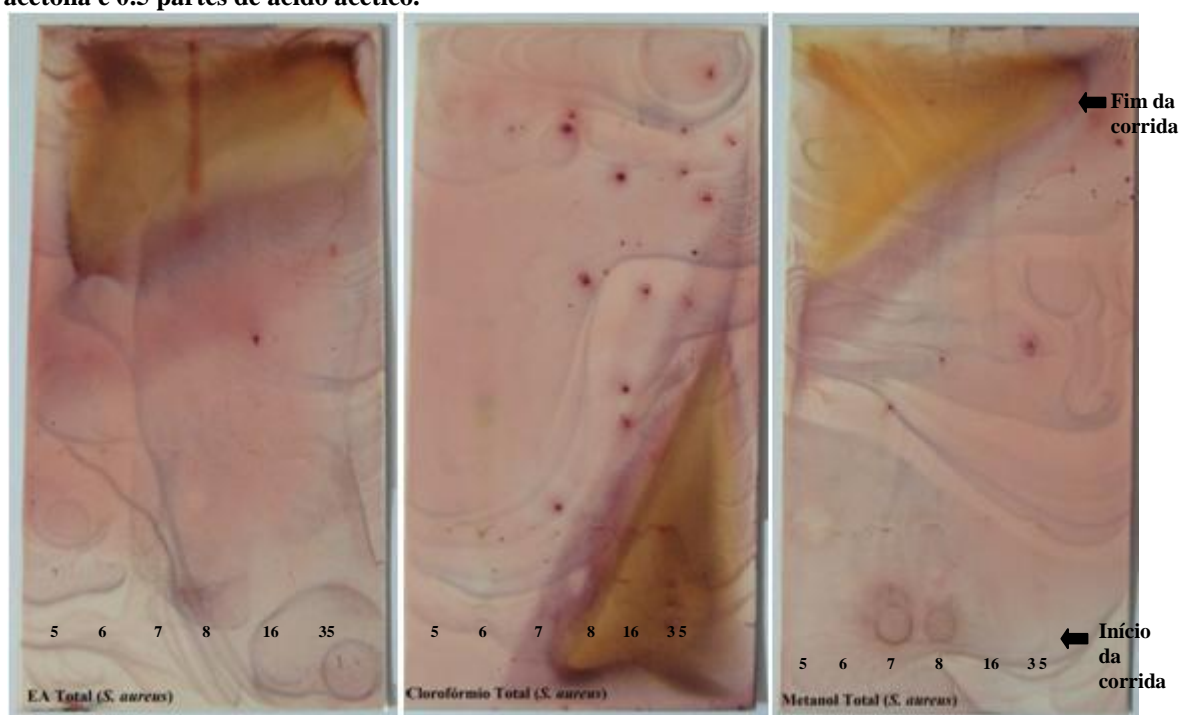


Figura 26 - Coloração adquirida pelas placas semeadas com *Staphylococcus aureus* após realização da técnica do MTT. Foi utilizada uma placa pré-revestida com alumínio, revestida com uma camada fina de sílica-gel (10 mm). O solvente utilizado continha 9 partes de tolueno, 1 parte de acetona e 0.5 partes de ácido acético.

Na figura 25, para as plantas extraídas com etil acetato, as amostras 5 e 6 inibem totalmente o crescimento bacteriano, enquanto as amostras 7, 8, 16 e 35 demonstram atividade contra *P. aeruginosa*, mas apenas no fim da placa de TLC. As amostras 5, 6, 7, 8 e 16, extraídas com clorofórmio, não inibem a bactéria, enquanto que a amostra 35 inibe-a ao longo de toda a placa. Já as plantas 5, 6, 7, 8, 16 e 35, extraídas com metanol, demonstram atividade antibacteriana apenas no início da corrida.

É possível verificar na figura 26, que as plantas extraídas com etil acetato, demonstram atividade antibacteriana no início da corrida, bem como para as plantas extraídas com metanol. No caso das plantas extraídas com clorofórmio, as amostras 5, 6 e 7 inibem totalmente o crescimento bacteriano, ao passo que as amostras 8, 16 e 35 demonstram atividade contra *S. aureus*, mas apenas no fim da placa de TLC.

#### 4.5 Atividade dos extratos vegetais em células animais

Este protocolo foi apenas aplicado às amostras que foram extraídas com metanol. Utilizando o teste do MTT para determinar a densidade ótica celular das células viáveis, após leitura das placas a 570 e 650 nm, foi calculada essa mesma densidade, subtraindo a  $DO_{570nm}$  à  $DO_{650nm}$ , para remover o ruído de fundo. Os valores encontrados estão representados no gráfico 22.

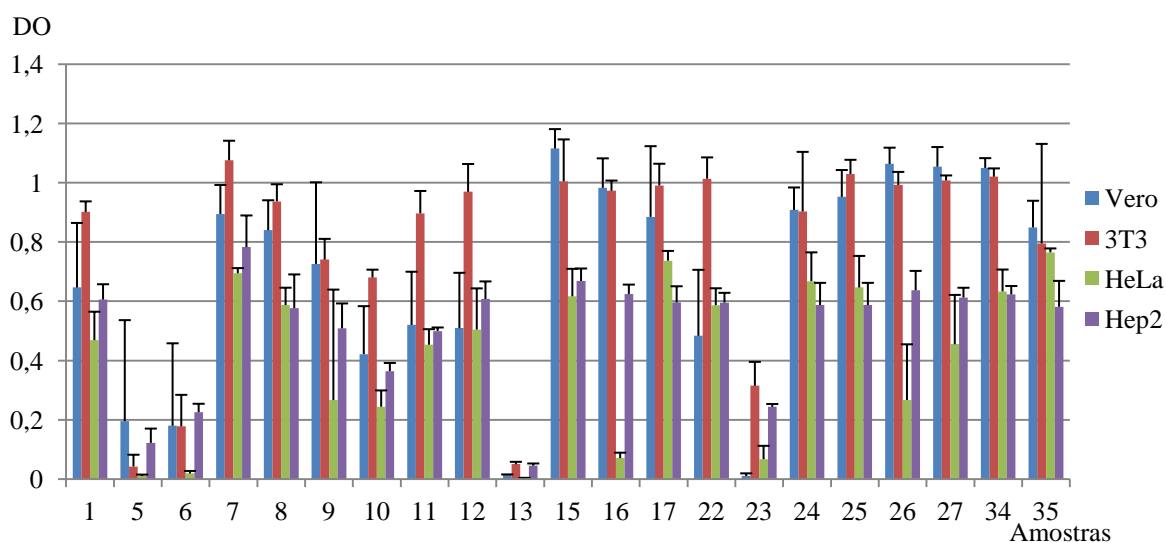
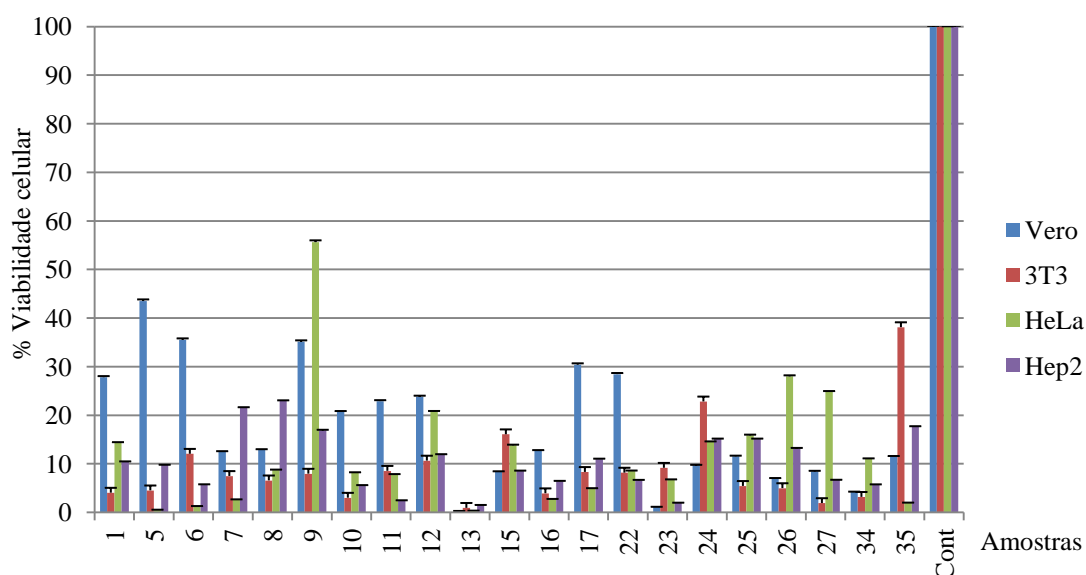


Gráfico 22 - Valores de DO obtidos após técnica MTT. Neste ensaio foram feitas 3 réplicas para cada amostra estando representado a sua média  $\pm$  SD.

Tendo como base os valores de absorvância obtidos e representados atrás, procedeu-se ao cálculo da percentagem de células viáveis, estando os resultados obtidos apresentados no gráfico 23.



**Gráfico 23 - Percentagens de células viáveis após exposição aos extratos testados (amostra 1 a 35) ± SD. Cont: Controlos negativos em que apenas constavam as células em meio de cultura.**

Para as células Vero, as amostras 1, 5, 6, 9, 17 e 22 foram aquelas que apresentaram maiores percentagens de viabilidade celular. As células 3T3, face à exposição aos extratos testados não demonstraram bons resultados, ressalvando unicamente a amostra 35, que apresentou boa viabilidade. Relativamente às células tumorais, as Hep2 apresentaram viabilidades celulares baixas para todas as amostras e as células HeLa também demonstraram bons resultados, excepto para a amostra 9, 26 e 27.

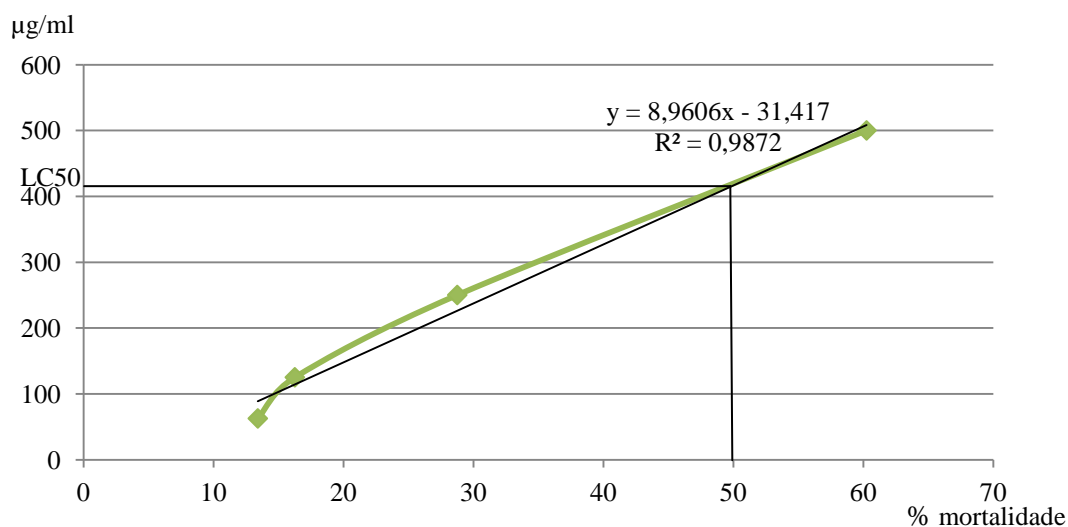
#### 4.6 Análise da atividade dos extratos vegetais em *Artemia salina*

Para os todos os extratos foram testadas, numa concentração inicial de 500 µg/ml, as suas propriedades toxicológicas em *A. salina*. Na tabela VII estão representadas as concentrações necessárias de extrato para obter 50% de mortalidade (LC50) dos crustáceos analisados.

Tabela VII - Concentrações necessárias de extrato para obter 50% de mortalidade (LC50) das *Artemia salina*. M: metanol; C: Clorofórmio; EA: Etil acetato.

Extrato	50% Mortalidade	Extrato	50% Mortalidade	Extrato	50% Mortalidade
1M	>500 µg/ml	1C	>500 µg/ml	1EA	>500 µg/ml
5 M	>500 µg/ml	5C	>500 µg/ml	5EA	>500 µg/ml
6M	>500 µg/ml	6C	>500 µg/ml	6EA	>500 µg/ml
7M	>500 µg/ml	7C	>500 µg/ml	7EA	>500 µg/ml
8M	>500 µg/ml	8C	>500 µg/ml	8EA	>500 µg/ml
9M	>500 µg/ml	9C	>500 µg/ml	9EA	>500 µg/ml
10M	>500 µg/ml	10C	>500 µg/ml	10EA	>500 µg/ml
11M	>500 µg/ml	11C	>500 µg/ml	11EA	>500 µg/ml
12M	>500 µg/ml	12C	>500 µg/ml	12EA	>500 µg/ml
13M	>500 µg/ml	13C	>500 µg/ml	13EA	>500 µg/ml
15M	>500 µg/ml	15C	>500 µg/ml	15EA	>500 µg/ml
16M	>500 µg/ml	16C	>500 µg/ml	16EA	>500 µg/ml
17M	>500 µg/ml	17C	>500 µg/ml	17EA	>500 µg/ml
22M	>500 µg/ml	22C	>500 µg/ml	22EA	>500 µg/ml
23M	>500 µg/ml	23C	>500 µg/ml	23EA	>500 µg/ml
24M	>500 µg/ml	24C	>500 µg/ml	24EA	>500 µg/ml
25M	>500 µg/ml	25C	417 µg/ml	25EA	>500 µg/ml
26M	>500 µg/ml	26C	>500 µg/ml	26EA	>500 µg/ml
27M	>500 µg/ml	27C	>500 µg/ml	27EA	>500 µg/ml
34M	>500 µg/ml	34C	>500 µg/ml	34EA	>500 µg/ml
35M	>500 µg/ml	35C	>500 µg/ml	35EA	>500 µg/ml

No gráfico 24, está representada o gráfico que traduz a LC50 para a amostra 25, extraída com clorofórmio, por ser a única em que houve mais de 50% de mortalidade das *Artemia salina* quando em contacto com aquele extrato em concentração de 1mg/ml. Para todas as outras amostras não houve mortalidade superior a 50% em nenhuma das concentrações testadas, sendo necessário portanto uma dose superior a 500 µg/ml para podermos calcular a LC50 para os restantes extratos (tabela VII).



**Gráfico 24 - LC50 para a amostra 25, extraída com clorofórmio.**

Utilizando a fórmula da reta do gráfico 24, calculámos a LC50, que para esta amostra (amostra 25 extraída com clorofórmio) é de 417 µg/ml.

#### **4.7 Ação dos extratos vegetais em *Toxoplasma gondii***

A determinação da densidade ótica celular das células viáveis foi feita após leitura das placas a 490 e 650 nm, tendo sido calculada através da subtração da  $DO_{490nm}$  à  $DO_{650nm}$ , para remover o espectro do ruído de fundo (anexo C).

Tomando como base os valores de absorvância obtidos, procedeu-se ao cálculo da percentagem de células viáveis. Os controlos (poços com células mas sem os extratos) correspondiam a 100%. Os resultados obtidos para as amostras extraídas com metanol estão apresentados no gráfico 25, com etil acetato no gráfico 26 e clorofórmio no gráfico 27.

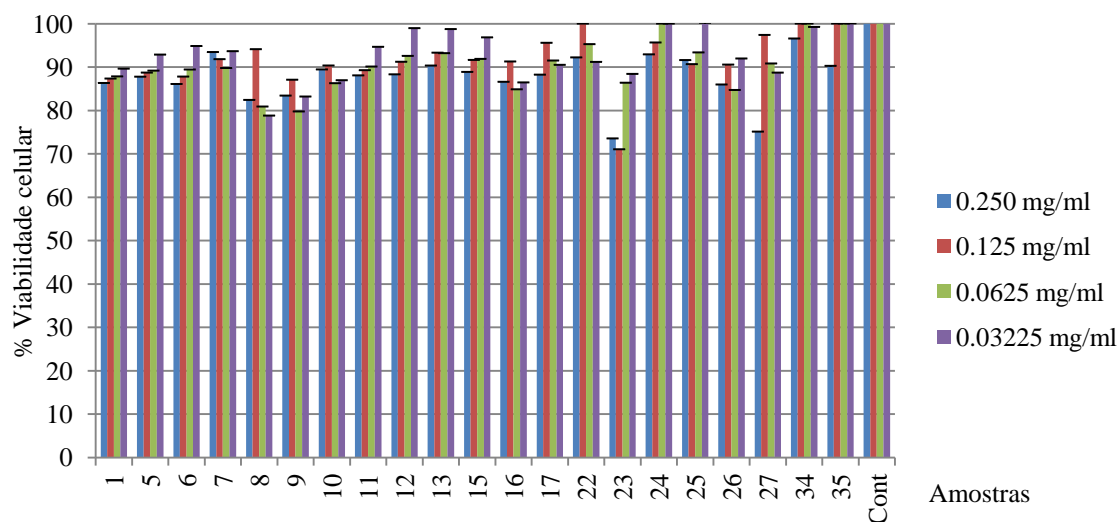


Gráfico 25 - Percentagem de células viáveis infectadas por *T. gondii*, após exposição às amostras extraídas com metanol  $\pm$  SD. Cont: Controlo negativo, contendo apenas meio de cultura.

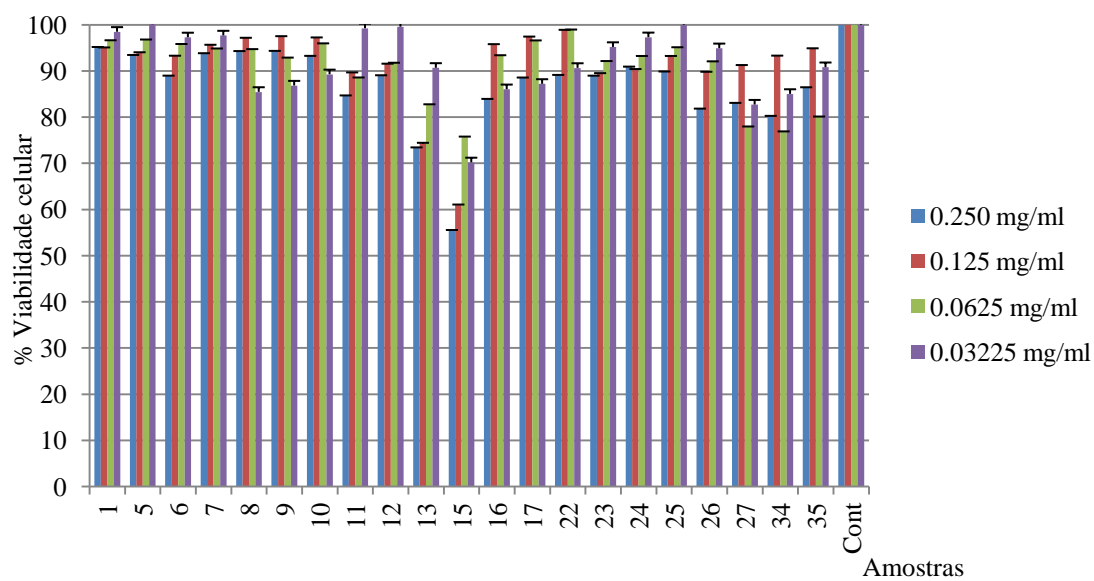
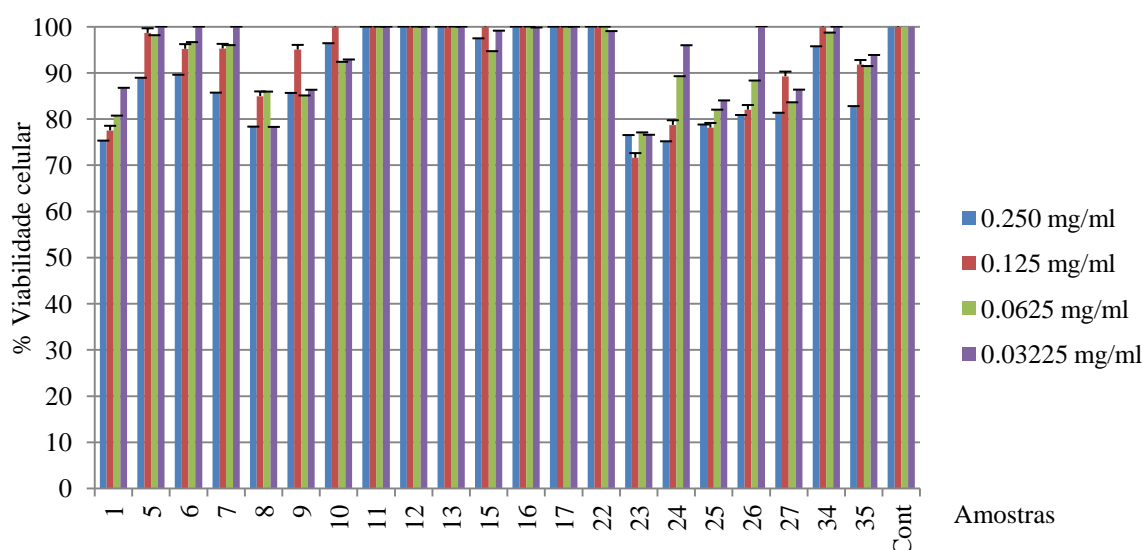


Gráfico 26 - Percentagem de células viáveis infectadas por *T. gondii*, após exposição às amostras extraídas com etil acetato  $\pm$  SD. Cont: Controlo negativo, contendo apenas meio de cultura.



**Gráfico 27 - Percentagem de células viáveis infectadas por *T. gondii*, após exposição às amostras extraídas com clorofórmio  $\pm$  SD. Cont: Controlo negativo, contendo apenas meio de cultura.**

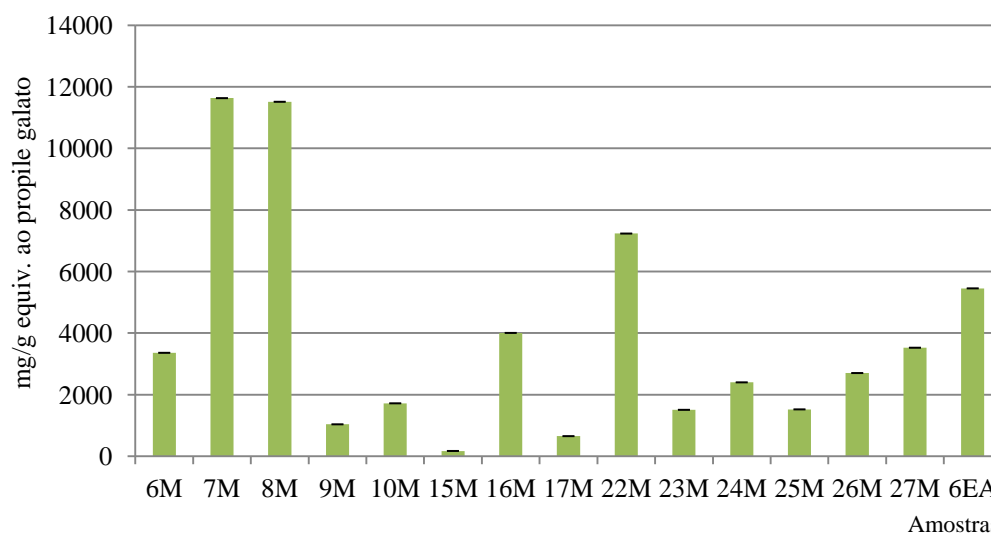
As células parasitadas que foram expostas à amostra 23, extraída com metanol, à amostra 15, extraída com etil acetato e às amostras 8, 23, 24, 25, extraídas com clorofórmio, demonstraram sofrer inibição celular. Todas as outras amostras mantiveram uma boa viabilidade celular. Assim, as amostras 23M, 15 EA, 8C, 23C, 24C e 25C demonstraram atividade inibidora contra *T. gondii*.

#### 4.8 Análise da composição em polifenóis dos extratos vegetais

Após leitura das placas espectrofotometricamente a 765 nm, obteve-se a reta de calibração para este teste, utilizando o propile galato para o efeito (anexo D).

Para os extratos vegetais diluídos a 1/5 as concentrações em mg/g equivalentes ao propile galato, estão representadas no anexo C. É possível verificar que as amostras 6M, 7M, 8M, 16M, 22M, 27M e 6EA são aquelas que apresentam maior concentração em polifenóis totais ultrapassando, quando diluídas de 1/5, as 10000 mg/g equivalentes ao propile galato. Amostras como a 11C, 12C e 9 EA possuem uma concentração em polifenóis totais igual a 0.

Para as amostras em que os valores da absorvância obtidos não se situavam dentro de reta de calibração, pois tinham valores muito elevados, foi feita uma diluição de 1/50 e os resultados obtidos são mostrados no gráfico 28.

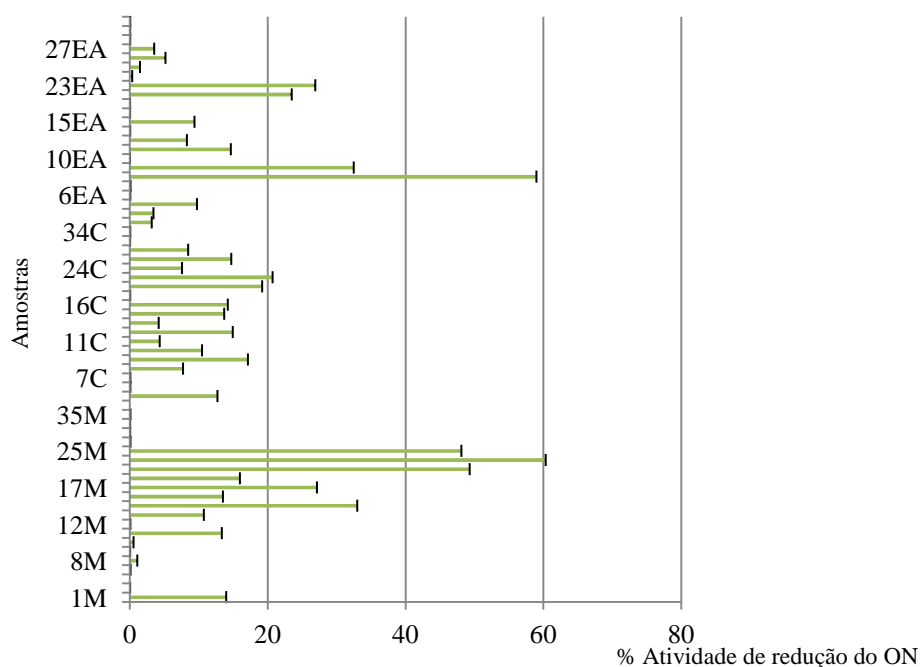


**Gráfico 28** - Concentrações em mg/g equivalentes ao propile galato dos extratos vegetais após diluição 1/50. Neste ensaio foram feitas 3 réplicas para cada amostra estando representado a sua média  $\pm$  SD.

#### 4.9 Análise da redução da atividade do óxido nítrico nos extratos vegetais

Obteve-se primeiramente a reta de calibração para este teste, utilizando o ácido ascórbico para o efeito e fazendo a leitura a 546nm (anexo E).

Após execução do restante protocolo e da leitura dos resultados obtidos e cálculo foi possível determinar a percentagem da atividade de redução do óxido nítrico, resultados que podemos ver no gráfico 29. Amostras como a 8EA e 24M são as que mais possuem capacidade redutora do óxido nítrico.

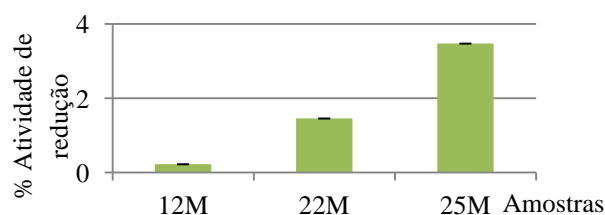


**Gráfico 29 - Percentagem da atividade de redução do óxido nítrico para cada amostra testada. Neste ensaio foram feitas 3 réplicas para cada amostra estando representado a sua percentagem  $\pm$  SD.**

#### 4.10 Análise da atividade antioxidante dos extratos vegetais (ABTS)

Para testar a atividade antioxidante dos extratos vegetais traçou-se a reta da calibração utilizando para tal efeito o ácido ascórbico, tendo a absorvância sido lida a 734 nm (anexo F).

Após leitura espectrofotométrica dos resultados a 734 nm e cálculo da percentagem de atividade de redução, apenas três amostras mostraram poder antioxidante, pelo teste do ABTS. O gráfico 30 mostra-nos que as amostras 12, 22 e 25, que haviam sido extraídas com metanol, apresentam percentagens de atividade de redução de 0.22%, 1.45% e 3.47%, respetivamente.

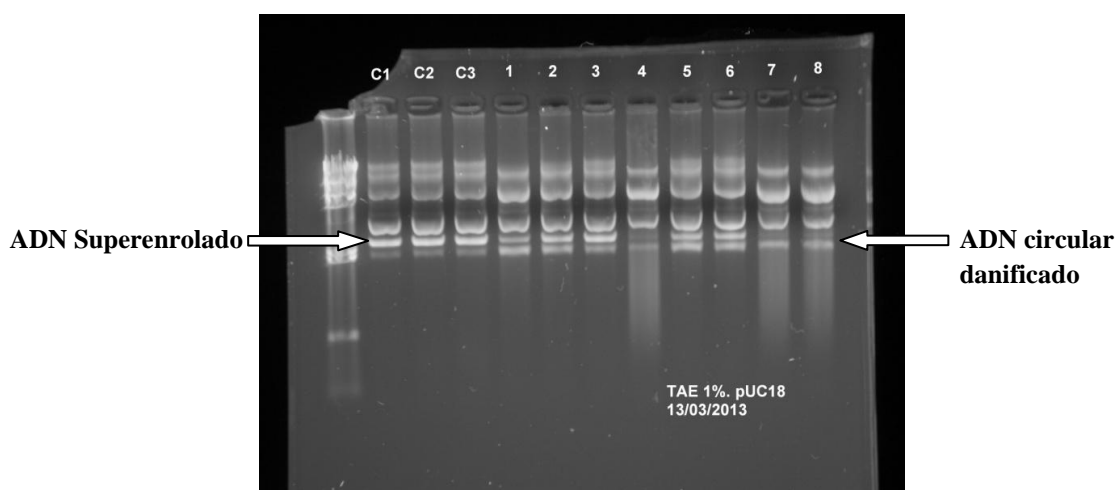


**Gráfico 30 - Percentagens de atividade de redução das amostras com poder antioxidante. Neste ensaio foram feitas 3 réplicas para cada amostra estando representado a sua percentagem  $\pm$  SD.**

Para todas as outras amostras, a percentagem de atividade de redução era igual a 0%.

#### 4.11 Reparação de ADN

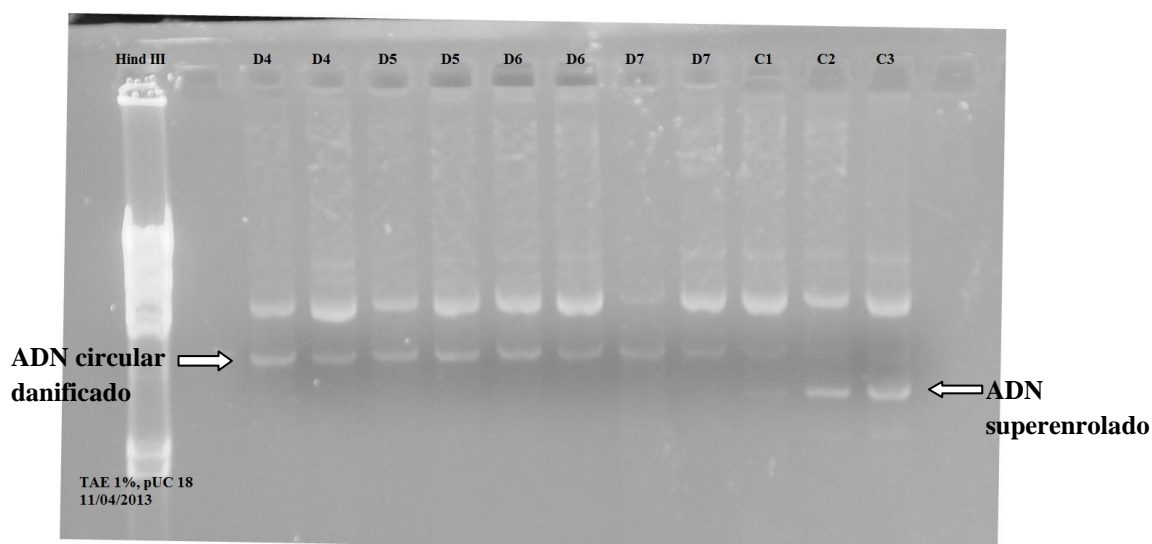
Após testar diferentes soluções para encontrar o reagente de Fenton que produzisse melhores resultados, foram obtidos por eletroforese os resultados visíveis na figura 27. Consegue-se perceber que a solução 4, composta por 1 ml de  $\text{NaHCO}_3$ , 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  e 8  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi aquela que melhor oxidou o ADN, fazendo com que o ADN superenrolado (C1, C2 e C3) se torna-se num ADN circular danificado, com quebras nas ligações fosfodiéster.



**Figura 27** - Gel obtido após corrida das recções testadas para obtenção do reagente de Fenton da reacção final (Tabela IV). C1: DNA+ $\text{NaHCO}_3$ ; C2:DNA+ $\text{FeCl}_3$ + $\text{NaHCO}_3$ ; C3:DNA+Cisteína+ $\text{NaHCO}_3$ ; 1: DNA+ $\text{FeCl}_3$ + $\text{NaHCO}_3$ +1 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 2: DNA+ $\text{FeCl}_3$ + $\text{NaHCO}_3$ +2 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 3: DNA+ $\text{FeCl}_3$ + $\text{NaHCO}_3$ +4 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 4: DNA+ $\text{FeCl}_3$ + $\text{NaHCO}_3$ +8 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 5:DNA+Cisteína+ $\text{NaHCO}_3$ +1 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 6: DNA+Cisteína+ $\text{NaHCO}_3$ +2 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 7: DNA+Cisteína+ $\text{NaHCO}_3$ +4 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 8: DNA+Cisteína+ $\text{NaHCO}_3$ +8 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Também foram testadas algumas soluções para encontrar a concentração de ácido ascórbico a utilizar na reacção final. Após a corrida de 7 soluções de diferentes concentrações (16  $\mu\text{M}$ ; 8 $\mu\text{M}$ ; 4 $\mu\text{M}$ ; 2 $\mu\text{M}$ ; 1 $\mu\text{M}$ , 0.5 $\mu\text{M}$  e 0.25 $\mu\text{M}$ ) deste ácido, no anexo G é possível observar os resultados obtidos. Após obtenção desses primeiros resultados, compreendeu-se que as primeiras diluições não eram eficazes, pelo que foi

repetida a reação apenas com as 4 diluições finais ( $2\mu\text{M}$ ;  $1\mu\text{M}$ ;  $0.5\mu\text{M}$  e  $0.25\mu\text{M}$ ) em duplicado. Na figura 28 é possível ver os resultados obtidos, apenas com as 4 diluições finais.

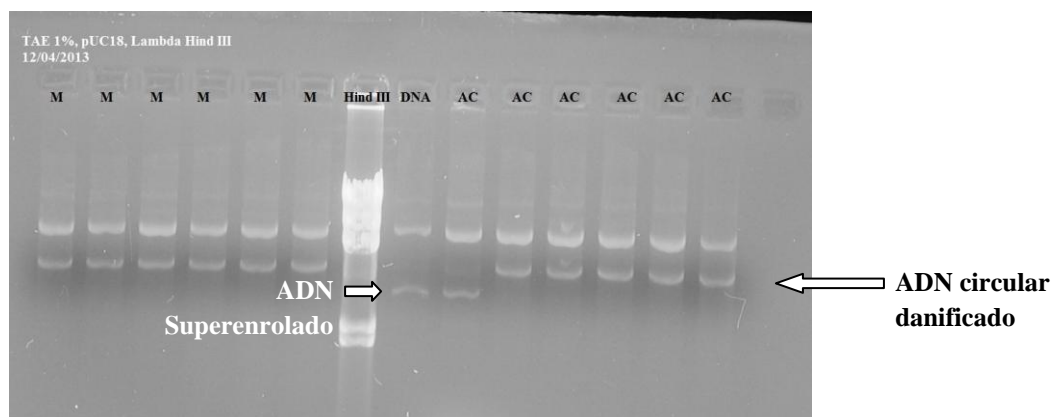


**Figura 28 - Segundo gel obtido após corrida das reacções testadas para obtenção da concentração ideal de ácido ascórbico para a reação final (Tabela V e VI). C1: DNA+H<sub>2</sub>O+Reagente de Fenton, C2:DNA+ H<sub>2</sub>O +NaHCO<sub>3</sub>, C3:DNA+ NaHCO<sub>3</sub> com FeCl<sub>3</sub>, D4: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico ( $2\mu\text{M}$ ); D5: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico ( $1\mu\text{M}$ ); D6: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico ( $0.5\mu\text{M}$ ); D7: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico ( $0.25\mu\text{M}$ ).**

É possível verificar que para a reação final, as três primeiras diluições revertem a degradação do ADN, mas contudo foi escolhida a amostra D6 ( $0.5\mu\text{M}$ ) para os procedimentos seguintes, por ser a amostra de menor concentração a obter os resultados desejados. No C1 visualiza-se uma forte banda, que consiste no ADN circular danificado, sendo visível no C2 e C3 uma banda mais pesada, que é o ADN superenrolado.

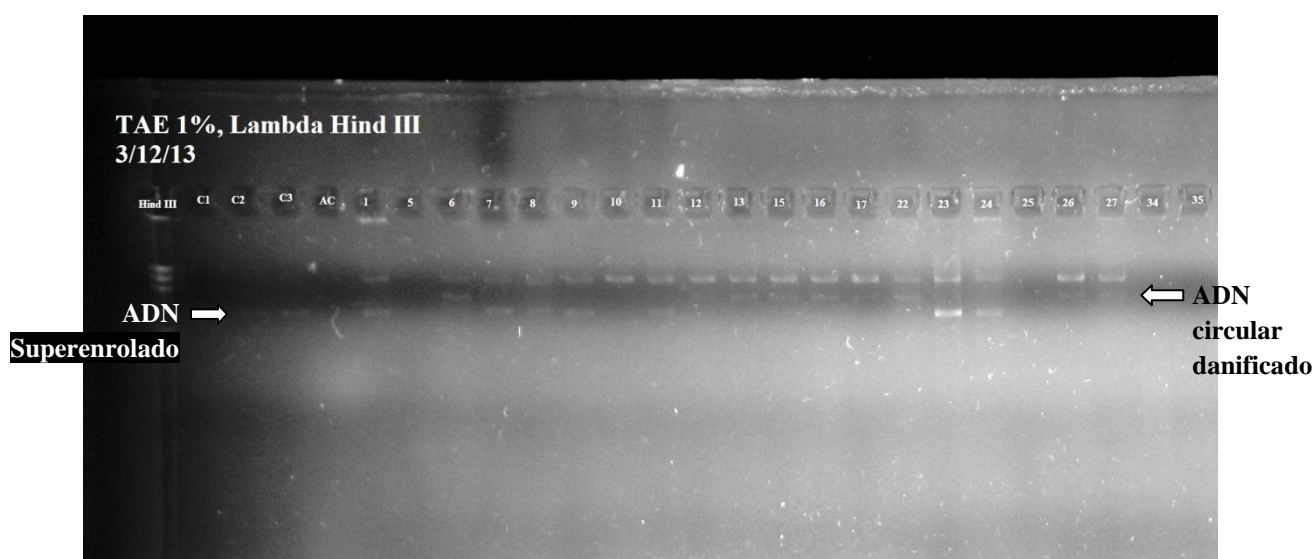
O ácido cafeico e a morina foram testados para servirem de controlos positivos à reação final. Foram feitas 6 diluições de 1/100 para cada um destes antioxidantes. Após corrida em gel de agarose obtivemos os resultados visíveis na figura 29. Para a morina é possível verificar que não houve reparação da quebra do ADN feito pelo reagente de Fenton, ao passo que o ácido cafeico, na concentração inicial de  $3.6\text{ mg/ml}$  foi capaz de reverter esse dano e devolver a forma inicial (superenrolada) ao ADN plasmídico.

Assim sendo na reação final utilizar-se-ia o ácido cafeico numa concentração de 3.6 mg/ml como controlo positivo.



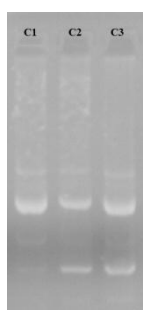
**Figura 29** - Gel obtido após corrida das recções testadas para obtenção da concentração ideal de morina e ácido cafeico a utilizar para a reação final. Para a morina não houve qualquer reparo do ADN, mas no caso do ácido cafeico, em concentração de 3,6 mg/ml houve regeneração do ADN testado. DNA: 1 µl do ácido nucleico; AC (Ácido cafeico): Da esquerda para a direita, diluições de 1/100 partindo da concentração inicial de 3.6 mg/ml; M (Morina): Da esquerda para a direita, diluições de 1/100 partindo da concentração inicial de 6 mg/ml.

Findo todo o processo de otimização da reação final, prosseguiu-se com o teste da capacidade de reparação do ADN por parte dos extratos estudados. Na figura 30 está o gel obtido para as amostras extraídas com metanol. Devido à má qualidade da imagem obtida dos resultados finais obtidos, é de referir que no primeiro poço foi colocado o marcador (Lambda Hind III), no 2º, 3º e 4º poço os controlos 1, 2 e 3 respetivamente e no 5º poço foi carregado a amostra do ácido cafeico. Os 21 poços seguintes são os dos extratos que usaram metanol como solvente de extração (por ordem numéricas, desde a amostra 1 até à 35).



**Figura 30 - Gel obtido após corrida da reação final para todas as amostras extraídas com metanol, onde se testou a capacidade de cada extrato em regenerar o ADN do plasmídeo. C1: DNA+H<sub>2</sub>O+Reagente de Fenton; C2:DNA+ H<sub>2</sub>O +NaHCO<sub>3</sub>; C3:DNA+ NaHCO<sub>3</sub> com FeCl<sub>3</sub>; AC: DNA+Ácido cafeico (3.6 mg/ml)+Ácido Ascórbico (0.5 mM)+Reagente de Fenton; Amostra de 1 a 35: DNA+extrato da planta correspondente+ Ácido Ascórbico (0.5 mM)+Reagente de Fenton.**

As amostras haviam todas sido testadas numa concentração de 40 µg/ml. Todos os controlos se comportaram com o esperado. No controlo 1 era visível a banda de ADN circular danificado, ao invés do C2 e C3, onde se visualiza uma banda mais pesada, correspondente ao ADN superenrolado. Apesar do comportamento dos controlos não ser muito visível na figura 30, a figura 31 demonstra mais de perto como se comportaram. Nos poços carregados com o ácido cafeico a 3.6 mg/ml, o resultado foi a reparação do ADN e conseqüente aparecimento da banda de ADN superenrolado, tendo o controlo positivo funcionado também.



**Figura 31 - Comportamento dos controlo utilizados na reação final. C1: DNA+H<sub>2</sub>O+Reagente de Fenton; C2:DNA+ H<sub>2</sub>O +NaHCO<sub>3</sub>; C3:DNA+ NaHCO<sub>3</sub> com FeCl<sub>3</sub>**

Na tabela VIII, estão os resultados obtidos para todas as amostras testadas. Para os extratos testados, aqueles que repararam o ADN da degradação pelo reagente de Fenton, foram os 1, 7, 8, 9, 11, 23 e 24 extraídos com metanol, os 9, 15 e 16 extraídos com clorofórmio e os 7, 15 e 17 extraídos com etil acetato. Todas as outras amostras continuaram degradadas, apresentando a banda de ADN circular danificada.

**Tabela VIII – Presença ou ausência de atividade reparadora de cada extrato, para o ADN. (+): Presença de atividade reparadora; (-): Ausência de atividade reparadora.**

Extrato	Atividade Reparadora	Extrato	Atividade Reparadora	Extrato	Atividade Reparadora
1M	+	1C	-	1EA	-
5 M	-	5C	-	5EA	-
6M	-	6C	-	6EA	-
7M	+	7C	-	7EA	+
8M	+	8C	-	8EA	-
9M	+	9C	+	9EA	-
10M	-	10C	-	10EA	-
11M	+	11C	-	11EA	-
12M	-	12C	-	12EA	-
13M	-	13C	-	13EA	-
15M	-	15C	+	15EA	+
16M	-	16C	+	16EA	-
17M	-	17C	-	17EA	+
22M	-	22C	-	22EA	-
23M	+	23C	-	23EA	-
24M	+	24C	-	24EA	-
25M	-	25C	-	25EA	-
26M	-	26C	-	26EA	-
27M	-	27C	-	27EA	-
34M	-	34C	-	34EA	-
35M	-	35C	-	35EA	-

## **Capítulo V – Discussão**

A descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais evoluiu para incluir vários campos de investigação e vários métodos de análise, que têm sido aplicados para a padronização de fármacos à base de plantas, com o intuito de nos elucidar sobre os seus compostos químicos e os seus efeitos sobre o corpo humano (Balunas e Kinghorn, 2005).

## 5.1 Determinação da suscetibilidade bacteriana aos extratos em meio sólido e líquido

Para as quatro estirpes de bactérias testadas procedeu-se a ensaios em meio sólido e em meio líquido. Os ensaios em meio sólido correspondem às sementeiras destes microrganismos em meio Mueller-Hinton, e os ensaios em meio líquido correspondem à determinação da CMI em meio TSB líquido.

### 5.1.1 Em meio sólido

Após a obtenção da biblioteca dos extratos vegetais, utilizando para a extração os solventes metanol, clorofórmio e etil acetato, as amostras que demonstraram melhor poder antibacteriano foram as amostras que correspondem respetivamente às plantas *Trichilia prieuriana prieuriana* (amostra 5), *Margaritaria discoidea* (amostra 6), *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8), *Ocimum gratissimum* (amostra 15), *Ocimum basilicum* (amostra 16) e *Calypetrochilum christyanum* (amostra 35). Como se pode verificar nos gráficos 1 a 21, os extratos totais, à exceção da amostra 27 (em que o extrato em metanol inibiu *P. aeruginosa*), não mostraram inibição relativamente às bactérias *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. É também visível que para esses mesmos extratos houve alguma inibição para *E. coli* e *S. aureus*. Sendo *P. aeruginosa* e *E. coli* bactérias Gram-negativas e *E. faecalis* e *S. aureus* bactérias Gram-positivas e face aos resultados obtidos, vemos que em primeira análise a constituição em peptidoglicanos da parede celular bacteriana não é um fator importante para a contribuição da inibição destas bactérias pelos extratos aqui estudados.

Para os extratos fracionados pela resina, nas amostras extraídas com metanol, que haviam tido os melhores resultados em extrato total (amostras 5, 6, 7, 8, 15, 16 e 35), houve aumento da inibição, pois os halos foram significativamente maiores.

Relativamente às frações dos extratos, podemos ver, através dos halos obtidos, que o fracionamento das amostras mostrou-se muito favorável à inibição bacteriana. Nas amostras que já haviam demonstrado produzir mais inibições em extrato total, o seu fracionamento do extrato levaria a um aumento da inibição bacteriana. O fracionamento permitiu separar os componentes orgânicos dos sais inorgânicos e concentrar os principais compostos ativos (Bugni *et al.*, 2008). De forma geral o metanol é extremamente útil na extração de glicosídeos, a água é útil na extração de saponinas (triterpenos), o clorofórmio é usado para extração de alcalóides, o etil acetato de flavenóides e o isopropanol de lípidos. A ação conjunta de clorofórmio com o metanol também é um bom solvente para extração de lípidos. Assim, analisando as amostras 5, 6, 7, 8, 15, 16 e 35, podemos ver que face aos resultados dos extratos vegetais para essas mesmas amostras em extrato total, as frações mostraram poder de inibição bacteriana muito superior.

Na amostra 5 (*Trichilia prieuriana prieuriana*), podemos observar que, após o fracionamento da amostra, a estirpe bacteriana *P. aeruginosa* passa a ser inibida pelo extrato, o que nos demonstra que a remoção de certos compostos, começando logo pela água (FWI), fizeram com que o extrato se tornasse mais mortal para esta bactéria. Sabendo que o fracionamento separou os sais inorgânicos e que a água é um bom extrator de triterpenos, podemos inferir que o que tornava as bactérias resistentes ao extrato seria algum desses compostos. Um fracionamento do extrato utilizando HPLC, poderia informar-nos qual o composto, de forma a purificá-lo e poderemos confirmar a sua ação anti - *P. aeruginosa*, usando esta planta. Relativamente às amostras 6 e 7 podemos inferir que se apresenta o mesmo tipo de atividade. Para *Combretum micrantum* (amostra 8), apesar de reagir do mesmo modo, relativamente às amostras 5, 6, 7 e 15, para a fração 5 (F5) não se observa qualquer inibição bacteriana. Esta fração foi extraída utilizando clorofórmio e metanol em igual proporção, os quais combinados são bons extratores de lípidos. Este tipo de extração pode-nos indicar que a remoção dos lípidos interferiu na ação antibacteriana do extrato, tal como aconteceu na amostra 16. Na amostra 35, após fracionamento pelos solventes, as fracções F2 e F3 apresentaram

atividade antibacteriana. O solvente de extração inclui isopropanol, o que nos indica que este removeu algum composto que inibia a ação antibacteriana. Deste modo, parece que o fracionamento das amostras determina um aumento da atividade anti-bacteriana, através da remoção de lípidos. Assim, pomos a hipótese de, fracionando os compostos destas plantas com HPLC, utilizando colunas de separação apropriadas, conseguiríamos identificar qual o composto biológico ativo que apresenta atividade anti-*P. aeruginosa*.

### 5.1.2 Em meio líquido

De acordo com o teste da concentração usado por Wink (2010) e Lagnika *et al.* (2011), para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* não foi possível encontrar a CMI utilizando as concentrações aplicadas. Deviam ser feitos mais testes utilizando concentrações superiores de extratos, de modo a comprovar a eficácia de algumas das amostras usadas no teste dos halos em meio sólido, em que amostras como *Capparis erythrocarpus* (amostra 12) mostraram ser bactericidas para *E. coli* em extrato total. O ideal seria seguidamente testar concentrações de 1 a 2 mg/ml.

*P. aeruginosa* demonstrou ser sensível a *Zanthoxylum leprieuri* (amostra 9), *Cassytha filiformis* (amostra 10) e *Calyptrochilum christyanum* (amostra 35) extraídas por metanol, numa concentração de 0.5mg/ml. Foi assim apurada a CMI para estas amostras. Contudo, para os extratos que utilizaram outros solventes de extração, não conseguimos encontrar essa concentração. *E. faecalis*, também para uma concentração de 0.5 mg/ml, foi inibida por *Margaritaria discoidea* (amostra 6), *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8), *Stophanthus sarmentosus* (amostra 13), *Faidherbia albida* (amostra 23) e *Hymenocardia acida* (amostra 27), extraídas com metanol.

Como no teste dos halos em meio sólido, cada inoculação de extrato no meio correspondia a 1 mg/ml, no caso do meio líquido (após as diluições), a concentração mais alta testada foi de 0.5 mg/ml, podendo ser esta a razão para os fracos resultados. Uma repetição do teste da CMI em meio líquido, com concentrações entre a 1 mg/ml até 2mg/ml seria necessário, para determinar se a dose de extrato testada não era muito baixa.

## 5.2 Aplicação da técnica de TLC

### 5.2.1 Extratos totais e frações de extratos por metanol, macroscopicamente e através de UV

Extratos de *Trichilia prieuriana prieuriana* (amostra 5), *Margaritaria discoidea* (amostra 6), *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8), *Ocimum basilicum* (amostra 16) e *Calyptrochilum christyanum* (amostra 35), extraídos com metanol, foram submetidos à separação por TLC.

Na figura 18 é possível ver os resultados obtidos, vendo que *Margaritaria discoidea* (amostra 6) e *Psychotrya peduncularis* (amostra 7) são aquelas que demonstram mais diferenças quanto ao solvente utilizado. *Margaritaria discoidea* (amostra 6) tem através da extração por clorofórmio uma melhor diferenciação dos seus componentes, ao passo que para *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), o metanol produz uma separação mais nítida. Apesar disso é possível verificar que para todas as amostras os componentes separados são muito similares em relação aos três solventes. Para as amostras fracionadas (figura 19), a separação dos componentes já não é tão visível por esta técnica, pois também se perderam muitos dos corantes naturais das plantas com o fracionamento, contudo é possível constatar que na F5 (fração 5) de *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), há alguns componentes que são concordantes com o do extrato total.

### 5.2.3 Testes químicos

Os extratos de *Trichilia prieuriana prieuriana* (amostra 5), *Margaritaria discoidea* (amostra 6), *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8), *Ocimum basilicum* (amostra 16) e *Calyptrochilum christyanum* (amostra 35), após serem submetidos à separação por TLC, foram pulverizados com determinados compostos químicos de forma a revelar a composição de cada extrato.

Através da pulverização com o reagente de Folin-Ciocalteu, verificámos que os fenóis se localizavam na zona inicial da placa, onde se havia iniciado a corrida. Esta zona, devido ao facto de termos usado um solvente apolar para a separação, continha maioritariamente as substâncias polares. Podemos deste modo inferir que os fenóis

polares destas amostras são mais preservados, quando o solvente de extração é o metanol.

Utilizando o reagente 4-(Dimetilamino)benzaldeído, a reação com terpenos foi muito fraca. Apenas para *Margaritaria discoidea* (amostra 6) é possível verificar, junto à zona inicial da corrida, uma pequena reação, indicativa da presença de terpenos na zona dos compostos polares.

O reagente Dragendorff-Munier demonstrou que para as amostras testadas, nas zonas dos compostos polares (início da placa), houve uma completa descoloração em torno dos compostos separados, o que nos indica ausência de alcalóides na zona dos compostos polares. Contudo, com o progredir da corrida, para *Trichilia prieuriana prieuriana* (amostra 5) e *Margaritaria discoidea* (amostra 6) é possível verificar que há a presença de alcalóides semi-polares (Silva e Aragão, 2009).

#### 5.2.4 Bioatividade dos extratos totais

Em relação ao crescimento bacteriano nas placas de TLC, o princípio baseia-se na técnica aplicada por Valgas *et al.* (2007). Para as bactérias *E. coli* e *E. faecalis* as placas ficaram cobertas totalmente pela cor púrpura decorrente da aplicação do MTT, e conseqüente crescimento celular. Sendo assim, há uma indicação de que apenas uma conjugação dos componentes dos extratos faz esse mesmo extrato ter atividade antibacteriana, pois quando há separação dos componentes, essa atividade parece perder-se. Já para *P. aeruginosa* e *S. aureus* a separação dos componentes determina um aumento da atividade antibacteriana, porque se observa nas placas de TLC inoculadas com estas bactérias, zonas em que não houve o seu crescimento.

Para *P. aeruginosa*, é possível verificar que são os componentes que mais migram que possuem a atividade antibacteriana, para todos os extratos testados, ao contrário daqueles extraídos por metanol, que têm os componente inibidores logo na zona inicial. Assim, e de acordo com o solvente utilizado, são os compostos apolares que promovem a atividade antibacteriana. Por sua vez, para aqueles testados com clorofórmio, há alguns extratos que não inibiram o crescimento, ao passo que *Ocimum basilicum* (amostra 16) e *Calyptrochilum christyanum* (amostra 35) parecem possuir uma completa ação bactericida.

As plantas extraídas com etil acetato demonstram atividade anti – *S. aureus* no início da corrida, bem como as plantas extraídas com metanol. *Trichilia prieuriana prieuriana* (amostra 5), *Margaritaria discoidea* (amostra 6) e *Psychotrya peduncularis* (amostra 7) extraídas com clorofórmio, inibem totalmente o crescimento de *S. aureus*, enquanto que *Combretum micratum* (amostra 8), *Ocimum basilicum* (amostra 16) e *Calypetrochilum christyanum* (amostra 35) demonstram atividade contra *S. aureus*, mas apenas na zona dos compostos apolares (fim da placa).

De forma geral, os compostos apolares demonstraram melhor atividade antibacteriana.

### 5.3 Células Animais – ensaios de citotoxicidade

As células animais foram testadas face à sua viabilidade celular após exposição aos extratos vegetais obtidos. As células usadas eram não tumorais (células Vero e 3T3) e tumorais (HeLa e Hep-2). Apenas foram testados os extratos das plantas extraídas com metanol, visto o metanol ser menos seletivo na extração.

As percentagens de viabilidade celular foram relativamente baixas para todos os tipos celulares, indicando que os extratos são tóxicos para estas células. Em relação às células não tumorais, as Vero foram as que apresentaram valores de viabilidade celular mais elevados, tendo as células 3T3 sido amplamente inibidas com os extratos testados. Relativamente às células Hep-2 e HeLa, os extratos demonstraram ser tóxicos para estes tipos de células tumorais, ao contrário do que aconteceu às células Vero e 3T3, à exceção de *Zanthoxylum leprieuri* (amostra 9), que apresentou boa viabilidade celular para as células HeLa. Face a estes resultados é possível inferir que as amostras testadas indiciam alguma atividade anti-tumoral, pois levaram à morte de mais de 50% das populações celulares testadas, numa concentração de 1mg/ml (Carmichael *et al.*, 1987; Garcia *et al.*, 2012). Contudo também se mostraram muito tóxicas para as células não tumorais. O cancro continua a ser uma das doenças para a qual se procuram mais terapêuticas que ajudem na sua prevenção ou cura. Plantas como as algas castanhas, *Catharanthus roseus* e *Camptotheca acuminata* (são conhecidos agentes quimiopreventivos (Zhang *et al.*, 2006; Balunas e Kinghorn, 2005). Tendo obtido

algumas evidências da atividade anti-tumoral destes extratos, futuramente, dever-se-á prosseguir para investigações sobre a composição química dos compostos, com vista ao isolamento das substâncias citotóxicas. A determinação da razão entre a LC50 das linhas celulares não tumorais e a LC50 das linhas tumorais seria importante, pois quanto maior for essa razão melhor será a atividade anti-tumoral destas células, pois a citotoxicidade dos compostos afetará as células tumorais e não as outras (Zirihi *et al.*, 2005).

#### **5.4 LC<sub>50</sub> para *Artemia salina***

Para todas as amostras testadas, à exceção da 26, a LC50 é superior a 500 µg/ml, ou seja, é preciso mais do que esta concentração para matar metade da população de *Artemia* testada. De acordo com Moshi *et al.* (2010), uma LC50 inferior a 1 µg/ml é altamente tóxica, entre 1 e 10 µg/ml é tóxica, entre 10 e 30 µg/ml é moderadamente tóxica, de 30 a 100 µg/ml é medianamente tóxica e uma LC50 superior a 100 µg/ml é não tóxica. A concentração mínima testada foi de 7,8 µg/ml, os resultados obtidos indicam-nos, que os extratos testados não são tóxicos para *Artemia*, o que se torna bastante vantajoso, pois o risco de toxicidade destas plantas na sua ação medicinal para o ser humano, deverá ser ainda menor.

A amostra 26 extraída em clorofórmio foi a única em que se conseguiu determinar a LC50, que é de 417 µg/ml, ou seja, foi o único extrato mais tóxico. Em suma, nenhum dos extratos por nós testados é tóxico para *A. salina*, representando estes resultados um bom indicador do uso destas plantas como futuros biofármacos. Também se constata que estes foram selecionados com base na sua utilização etnobotânica.

#### **5.5 *Toxoplasma gondii***

O desenvolvimento de fármacos para doenças parasitárias como a toxoplasmose, que é uma das zoonoses mais comuns em todo o mundo, tem sido largamente

negligenciado (Kavitha *et al.*, 2012). Os fármacos utilizados para o tratamento desta doença são pouco eficazes, apenas atuando contra os taquizoítos, evoluindo a infeção aguda para uma infeção crónica, que se manterá por toda a vida dos infetados.

*Faidherbia albida* (amostra 23) extraída com metanol, *Ocimum gratissimum* (amostra 15) extraída com etil acetato e *Combretum micratum* (amostra 8), *Faidherbia albida* (amostra 23), *Cnestis ferrugínea* (amostra 24) e *Landolphia dulcis* (amostra 25), extraídas com clorofórmio, foram as amostras que inibiram o crescimento celular das células Vero parasitadas por *T. gondii*, em concentrações entre 0.250 mg/ml e 0.03225 mg/ml. Estes resultados dão-nos indicação que estes extratos têm atividade contra este parasita. Para estas amostras seria necessário fracionar os seus compostos e testar outras concentrações de forma a confirmar a atividade contra o *T. gondii* e a determinar a LC<sub>50</sub> para cada extrato, tal como Choi *et al.* (2008) demonstrou para outras 15 plantas.

## 5.6 Composição dos extratos vegetais testados em polifenóis, óxido nítrico e antioxidantes

Foram encontrados alguns extratos com elevadas concentrações de polifenóis, como o de *Margaritaria discoidea* (amostra 6), *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8), *Ocimum basilicum* (amostra 16), *Khaya senegalensis* (amostra 22) e *Hymenocardia acida* (amostra 27) extraídos com metanol, e o de *Margaritaria discoidea* (amostra 6) extraído com etil acetato. Estes extratos continham concentrações de polifenóis entre os 170 e 11600 mg/g equivalentes ao propile galato.

Os polifenóis são dos produtos mais importantes para a saúde humana, pois são bons antioxidantes e são eficazes na prevenção de doenças cardiovasculares, inflamatórias e cancerígenas (Lagnika *et al.*, 2011). Mesmo após várias diluições as amostras de *Margaritaria discoidea* (amostra 6), *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8) e *Khaya senegalensis* (amostra 22) extraídas com metanol, e a amostra de *Margaritaria discoidea* (amostra 6), extraída com etil acetato continuaram a demonstrar uma alta concentração em polifenóis. Assim, e atendendo que as amostras de *Margaritaria discoidea* (amostra 6), *Psychotrya peduncularis* (amostra

7), *Combretum micratum* (8), foram também amostras que demonstraram maior atividade antibacteriana, podemos considerar estas plantas como promissoras quer na produção de fármacos antibacterianos, quer de fármacos quimiopreventivos. Atualmente, apesar de ser importante a descoberta de novos fármacos para o combate a bactérias, que se foram tornando resistentes aos antibacterianos usados no seu combate, é também importante combater e prevenir a epidemia deste século, o cancro. Assim, tendo sido encontradas plantas ricas em compostos polifenólicos, demos o primeiro passo para poder isolar e estudar todos os seus componentes e testar os seus poderes na prevenção do cancro. Eram mesmo esses os passos que deveriam ser seguidos por nós, para demonstrar a eficácia ou não destas plantas.

*Combretum micratum* (amostra 8), extraído com etil acetato, e *Faidherbia albida* (amostra 23), *Cnestis ferruginea* (amostra 24) e *Landolphia dulcis* (amostra 25), extraídas com metanol, foram aquelas que demonstraram maior poder de atividade na redução de óxido nítrico. São estas as amostras que contêm maior poder no combate às propriedades tóxicas dos produtos resultantes das reações do ON com radicais de oxigénio e superóxido. Assim, e tendo em conta os resultados obtidos, os extratos destas plantas podem ser úteis na prevenção e atraso da progressão de doenças por *stress* oxidativo, sendo também esta uma informação útil para o desenvolvimento de fármacos a partir destas amostras, podendo fornecer uma plataforma para investigadores, bem como fornecer um ponto de partida para o desenvolvimento de novos antioxidantes naturais, mais modernos e potentes (Singh *et al.*, 2012). *Combretum micratum* (amostra 8) teve bastante poder na redução do ON, com a extração por etil acetato. Esse facto pode ser indicativo da presença de flavenóides extraídos, que representam um importante papel na ação antioxidante desta amostra.

O teste do ABTS pode ser usado para medição da atividade total de antioxidantes, de substâncias puras e misturas aquosas (Rice-Evans *et al.*, 1995; Rice-Evans *et al.*, 1996; Re *et al.*, 1999). Uma vez que uma grande parte dos antioxidantes utilizados hoje em dia provém de plantas, utilizámos também o teste do ABTS, para determinar a atividade antioxidante, tendo encontrado três amostras com relativa capacidade antioxidante, *Capparis erythrocarpus* (amostra 12), *Khaya senegalensis* (amostra 22) e *Landolphia dulcis* (amostra 25), todas extraídas com metanol. Apesar de terem percentagens de atividade de redução relativamente baixas (0.22%, 1.45% e 3.47%,

respetivamente), estas são as amostras que demonstraram produzir atividade antioxidante. Assim, após purificação dos extratos (com diferentes técnicas de cromatografia, por exemplo) este teste deveria ser repetido de forma a confirmar os resultados obtidos.

## 5.7 Análise da reparação do ADN

Após adição do reagente de Fenton ao ADN e sua consequente quebra, foram encontrados alguns extratos que conseguiram devolver a forma superenrolada ao ácido nucleico. Essas amostras foram *Ficus polita*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum*, *Zanthoxylum leprieuri*, *Cisampelos mucronata*, *Faidherbia albida* e *Cnestis ferrugínea*, extraídas com metanol, *Zanthoxylum leprieuri*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum*, extraídas com clorofórmio e *Psychotrya peduncularis*, *Ocimum gratissimum* e *Abrus precatorius*, extraídas com etil acetato. Devido ao grande número de amostras, todos os extratos foram testados numa única concentração de 40 µg/ml (Lee *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2010). Como este foi o primeiro teste para determinar a eventual atividade reparadora do ADN, no caso dos extratos que mostraram indícios dessa atividade, dever-se-iam testar nas concentrações de 30, 20 e 10 µg/ml, na tentativa de estabelecer uma relação de dependência ou não dependência entre o poder antioxidante e reparador de cada extrato, com a dose testada.

*Ficus polita* (amostra 1), *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8), *Zanthoxylum leprieuri* (amostra 9), *Cisampelos mucronata* (amostra 11), *Ocimum gratissimum* (amostra 15), *Ocimum basilicum* (amostra 16), *Abrus precatorius* (amostra 17), *Faidherbia álvida* (amostra 23) e *Cnestis ferrugínea* (amostra 24), foram as que mostraram poder antioxidante para reparação do ADN do plasmídeo pUC18. A proteção oferecida pelos extratos pode ser explicada pela sua capacidade em reprimir os radicais hidroxilo produzidos pela reação de Fenton (Sekhar *et al.*, 2013), apesar de não haver estudos conclusivos nesta área, com as plantas acima mencionadas. Estudos anteriores revelaram uma relação direta entre a atividade antioxidante e teor de fenóis totais. Halliwell e Gutteridge (1990) defenderam que um polifenol para ser definido como um antioxidante deveria, quando presente em baixas

concentrações em relação ao substrato a ser oxidado, atrasar, retardar, ou prevenir a oxidação mediada por radicais livres (Kumar *et al.*, 2010). Estudos como o de Almeida *et al.* (2008) demonstraram que o efeito protetor de *J. regia* contra os radicais hidroxilo estavam relacionados com a presença de flavenóides nos extratos. Ainda, em outro estudo, Benherlal e Arumughan (2008) demonstraram o efeito protetor de compostos comuns como a vitamina C, ácido gálico e algumas plantas medicinais, no dano do ADN conferido pelo reagente de Fenton. Através desses achados é que se torna possível prever que uma amostra que tenha protegido o ADN do dano provocado pelo reagente de Fenton, tenha na sua constituição polifenóis.

Amostras como *Psychotrya peduncularis* (amostra 7), *Combretum micratum* (amostra 8) e *Ocimum basilicum* (amostra 16) já tinham revelado, através da utilização do reagente de Folin-Ciocalteu, uma elevada concentração de polifenóis, mas através deste método de reparação do ADN, também para as amostras *Ficus polita* (amostra 1), *Zanthoxylum leprieuri* (amostra 9), *Cisampelos mucronata* (amostra 11), *Ocimum gratissimum* (amostra 15), *Abrus precatorius* (amostra 17), *Faidherbia álvida* (amostra 23) e *Cnestis ferrugínea* (amostra 24) ficou provado a existência de algum teor em polifenóis, e daí a sua atividade antioxidante.

## **Capítulo VI - Conclusões**

Este trabalho procurou identificar plantas promissoras para o desenvolvimento de fármacos antibacterianos, antiparasitários ou quimiopreventivos.

De entre as plantas testadas, as espécies *Trichilia prieuriana prieuriana*, *Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum basilicum* e *Calyptrorchilum christyanum* foram as plantas que demonstraram melhor atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. Depois de fracionado o extrato destas plantas através da utilização da resina Diaion HP-20, observou-se que houve um incremento da atividade anti-bacteriana, para as frações eluídas com 50-70% de isopropanol. Pode-se afirmar que estas plantas se apresentam como promissoras a nível da pesquisa de fármacos antibacterianos. Após separação dos extratos destas plantas por TLC, os compostos apolares demonstraram, de forma geral, melhor atividade antibacteriana. Foi também possível comprovar que alguns dos compostos biologicamente ativos destas plantas são os fenóis e alcalóides através da utilização de soluções indicadoras.

As plantas testadas neste trabalho indicaram alguma atividade anti-tumoral (células HeLa e Hep2). Contudo, também se mostraram muito tóxicas para as células controlo (Células Vero e 3T3).

Os extratos das plantas *Faidherbia albida*, extraída com metanol, *Ocimum gratissimum* extraída com etil acetato e *Combretum micratum*, *Faidherbia albida*, *Cnestis ferruginea* e *Landolphia dulcis*, extraídas com clorofórmio, demonstraram atividade anti- *T. gondii*.

Os extratos metanólicos das plantas *Ficus polita*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum*, *Zanthoxylum leprieuri*, *Cisampelos mucronata*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum basilicum*, *Abrus precatorius*, *Faidherbia albida* e *Cnestis ferruginea*, demonstraram maior atividade antioxidante, tornando-se assim promissores para a pesquisa de fármacos quimiopreventivos.

*Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum* e *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum* foram as plantas que demonstraram melhores evidências de atividade antibacteriana, antiparasitária e quimiopreventiva, apresentando por isso potencial quanto ao desenvolvimento de fármacos, a partir dos seus extratos. Futuramente, deve-se à aprofundar o conhecimento sobre estas plantas, utilizando diferentes técnicas, como o HPLC, mas também deve-se á recorrer aos

métodos utilizados neste trabalho, de modo a testar novas concentrações dos extratos destas plantas para cada teste, de forma a obter um conhecimento mais aprofundado sobre as ações de *Margaritaria discoidea*, *Psychotrya peduncularis*, *Combretum micratum* e *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum*.

## **Referências Bibliográficas**

Abdullahi, A. A. 2011. Trends and challenges of traditional medicine in Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 8(S):115-123.

Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Grawert, T., Arigoni, D., Bacher, A. & Rohdich, F. 2002. Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19): 12108-12113.

Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J., Costa, P.C. & Bahia, M.F. 2008. Walnut [*Juglans regia*] leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chemistry*, 106: 1014-1020.

American Type Culture Collection (ATCC), 2011. *MTT cell proliferation Assay*. [Online] Disponível em: [www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx](http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx). Acedido em 23 Outubro 2013.

American Type Culture Collection (ATCC), 2011. *XTT Cell Proliferation Assay Kit*. [Online] Disponível em: <http://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>. Acedido em 23 Outubro 2013.

Andreo, D. & Jorge, N. 2006. Antioxidantes naturais: Técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(2):319-336.

Atindehou, K. K., Schmid, C., Brun, R., Koné, M. W. & Traore, D. 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from C<sup>o</sup>te d'Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 221–227.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.*, Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. Páginas: 1.6.1-1.6.10.

- Aviello, G., Canadanovic-Brunet, J. M., Milic, N., Capassol, R., Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O., Fasolino, I., Izzo, A. A. & Borrelli, F. 2011. Potent Antioxidant and Genoprotective Effects of Boeravinone G, a Rotenoid Isolated from *Boerhaavia diffusa*. *PLoS One*, 6(5):1-11.
- Bajracharya, G. B. & Tuladhar, S. M. 2011. Brine-shrimp Bioassay for Assessment of Anticancer Property of Essential Oils from Spices. *Nepal Journal of Science and Technology*, 12:163-170.
- Balakrishnan, N., Panda, A. B., Raj, N. R., Shrivastava, A. & Prathani, R. 2009. The Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity of *Acalypha Indica* Linn Root. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2(2): 148-150.
- Balunas, M. J. & Kinghorn, A. D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Elsevier*, 78: 431 – 441.
- Benherlal, P. S. & Arumughan, C. 2008. Studies on modulation of DNA integrity in Fenton's system by phytochemicals. *Mutation Research*, 648(1-2):1-8.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Dévéhat, F. L. & Boustie, J. 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10:499–503.
- Bugni, T. S., Harper, M. K., McCulloch, W. B., Reppart, J. & Ireland, C. M. 2008. Fractionated Marine Invertebrate Extract Libraries for Drug Discovery. *Molecules* 13:1372-1383.
- Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, M. Á. & Vallès, J. 2003. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 199–209.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Mitchell, J. B. 1987 Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Research*, 47:936-942.

Carvalho, C. & Farhat, C. K. 1999. Toxoplasmose adquirida. *Journal Pediatrics*, 75(1):63-67.

Choi, K.M., Gang, J. & Yun, J. 2008 Anti-Toxoplasma gondii RH strain activity of herbal extracts used in traditional medicine. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32:360–362.

Cragg, G. M. & Newman, D. J. 2005. Drug Discovery and Development from Natural Products: The Way Forward. 11ª edição NAPRECA Symposium Book of Proceedings. Páginas 56-69 Antananarivo, Madagascar.

De, S., Dey, Y. N. & Ghosh, A. K. 2010. Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorphaphallus paeoniifolius* (Araceae). *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research*, 1(5):150-157.

Diniz, M. A. & Martins, E. S. 2005. Plantas medicinais na Guiné-Bissau. *África Today Foco Tropical*, Fevereiro páginas 110-111.

Folin, O. & Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 27:627-650.

Garcia, C., Lambert, A., Henriques, J. & Ely, M. 2012. Avaliação *in vitro* do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais. *Scientia Medica*, 22(3):131-137.

Gentox, 2012 [Online]. Disponível em: <http://gentox.bio.br/wp-content/uploads/2012/10/96-pocos.jpg>. Acedido a 23 de Outubro de 2013.

Gurib-Fakim, A. 2005. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Elsevier*, páginas 1-93.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186:1-85.

Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D. & Rohdich, F. 2001. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proceeding of the national academy of sciences*, 98(26): 14837–14842.

Indjai, B., Catarino, L. & Mourão, D. 2010. Mezinhos de Orango – Plantas medicinais e pessoas da ilha da Rainha Pampa. IBAP, Bissau.

Jones-Brando, L., Torrey, E. F. & Yolken, R. 2003. Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. *Schizophrenia Research*. 62(3):237-244.

Kavitha, N., Noordin, R., Chan, K. & Sasidharan, S. 2012. In vitro Anti-*Toxoplasma gondii* Activity of Root Extract/Fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12:91.

Khattak, S. F., Spataro, M., Roberts, L. & Roberts, S. C. 2006. Application of colorimetric assays to assess viability, growth and metabolism of hydrogel-encapsulated cells. *Biotechnology Letters*, 28:1361–1370.

Kumar, A., Kaur, R. & Arora, S. 2010. Free radical scavenging potential of some Indian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(19):2034-2042.

Lagnika, L., Anago, E., Atindehou, M., Adjahoutonon, B., Dramane, K. & Sanni, A. 2011. Antimicrobial activity of *Crataeva religiosa* Forst against bacteria isolated from

*Thryonomys swinderianus* Temminck. *African Journal of Biotechnology*, 10(49):10034-10039.

Lappalainen, K., Jaaskelainen, I., Syrjanen, K., Urtti, A. & Syrjanen, S. 1994. Comparasion of cell proliferation and toxicity assay using two cationic lipossomes. *Pharmaceutical Research*, 11(8): 1127-1131.

Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J. & Jang, Y.S. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22): 6490–6496.

Ling, L. T., Yap, S. A., Radhakrishnan, A. K., Subramaniam, T., Cheng, H. M. & Palanisamy, U. D. 2009. Standardised *Mangifera indica* Extract in an ideal antioxidant. *Food Chemistry*, 113:1154-1159.

MacClatcheya, W. C., Mahadyb, G. B., Bennettc, B. C., Shielsa, L. & Savod, V. 2009. Ethnobotany as a Pharmacological Research Tool and Recent Developments in CNS-active Natural Products from Ethnobotanical Sources. *Pharmacology & Therapeutics*. 123(2): 239–254.

MaCDonald, J. A. 1995. Medicinal Plants Exploration – Past and Present. *Arnoldia*, páginas 3-12.

Mayur, B., Sandesh, S., Shruti, S. & Sung-Yum, S. 2010. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(15):1547-1553.

Michael, A. S., Thompson, C. G. & Abramovitz, M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science*, 123(3194):464.

- Michael, A., Berset, C., Kessler, M. & Hamburger, M. 2009. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders—A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 121: 343–359.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85:231-237.
- Morales, R. 1996. Farmacología y farmacognósia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica. *Monografías del Jardín Botánico de Córdoba*, 3: 93-98.
- Moshi, M. J., Innocent, E., Magadula, J. J., Otieno, D. F., Weisheit, A., Mbabazi, P. K. & Nondo, R. S. 2010. Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in Kagera Region, North Western Tanzania. *Tanzania Journal of Health Research*, 12(1): 63-67.
- Mukherjee, P. K., Venkatesh, P. & Ponnusankar, S. 2010. Ethnopharmacology and integrative medicine – Let the history tell the future. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 1(2): 100–109.
- Muthaura, C. N., Rukunga, G. M., Chhabra, S. C., Omar, S. A., Guantai, A. N., Gathirwa, J. W., Tolo, F. M., Mwitari, P. G., Keter, L. K., Kirira, P. G., Kimani, C. W., Mungai, G. M. & Njagi, E. N. M. 2007. Antimalarial Activity of Some Plants Traditionally used in Meru district of Kenya. *Phytotherapy. Research*, 21: 860–867.
- Pan, S., Zhou, S., Gao, S., Yu, Z., Zhang, S., Tang, M., Sun, J., Ma, D., Han, Y., Fong, W. & Ko, K. 2013. New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 1-25.

- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G. & Buela, L. I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5): 395-400.
- Petrovska, B. B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11): 1–5.
- Pisutthanan, S., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S. & Muanrit, O. 2004. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. *Naresuan University Journal*, 12(2):13-18.
- Prasanthi, D. & Lakshmi, P. K. 2012. Terpenes: Effect of lipophilicity in enhancing transdermal delivery of alfuzosin hydrochloride. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 3(4): 216–223.
- Quach, H. T., Steeper, R. L. & Griffin, W. 2004. An Improved Method for the Extraction and Thin-Layer Chromatography of Chlorophyll a and b from Spinach. *Journal of Chemical Education*, 81(3):385 – 387.
- Ramos-Escudero, F., Muñoz, A. M., Alvarado-Ortíz, C., Alvarado, A. & Yáñez, J. A. 2012. Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds Profile and Its Assessment as an Agent Against Oxidative Stress in Isolated Mouse Organs. *Medicinal Food*, 15(2):206–215.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10):1231–1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20:933–956.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, G. P., Bramley, P. M. & Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22:375–383.

Sambrook, J., Fritsch E.F., & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. & Latha, L. Y. 2011. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 8(1):1-10.

Sekhar, S., Sampath-Kumara, K. K., Niranjana, S. R. & Prakash, H. S. 2013. *In vitro* antioxidant activity, lipoxygenase, cyclooxygenase-2 inhibition and DNA protection properties of *Memecylon* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2): 257-262.

Sigma-Aldrich Co. 2010. Cell Types & Culture Characteristics. *Cook Book Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*, 2<sup>a</sup> edição, Volume 12.

Silva, I. & Aragão, C. 2009. Extraction parameters from *Cinchona pubescens* Vahl using pharmacopeia and no pharmacopeia methods. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(3) .

Simon, J. E., Koroch, A. R., Acquaye, D., Jefthas, E., Juliani, R. & Govindasamy, R. 2007. Medicinal Crops of Africa. *Botanicals and Medicinals: Issues in new crops and new uses*, páginas 322 – 331.

Singh, D., Mishra, M., Gupta, M., Singh, P., Gupta, A. & Nema, R. 2012. Nitric Oxide radical scavenging assay of bioactive compounds present in methanol Extract of *Centella asiatica*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research*, 2(3): 42-44.

Valgas, C., Souza, S. M., Smânia, E. F. A. & Junior, A. S. 2007 Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:369-380.

Verma, A. R., Vijayakumar, M., Rao, C. V. & Mathela, C. S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2):704–709.

Wink, M. 2010. Biochemistry of plant secondary metabolism, 2ª edição volume 40, *Blackwell Publishing Ltd Annual plant review*, Reino Unido.

Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A. & Barrow, C. J. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18:445-450.

Zirihi, G., Mambu, L., Guédé-Guina, F., Bodo, B. & Grellier, P. 2005. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 98:281–285.

**Anexos**

## Anexo A

Tabela com gramas de extracto obtido, sua concentração e volume necessário para perfazer 1mg/ml.

Amostra (Metanol)	g de extrato	g/ml de extrato	1 mg/ml (µl)
1	0.0280	0.0700	5.7
5	0.0532	0.1330	3
6	0.0155	0.0390	10.3
7	0.0181	0.0450	8.9
8	0.0332	0.0830	4.8
9	0.0183	0.0450	8.9
10	0.0256	0.0640	6.3
11	0.0349	0.0873	4.6
12	0.0243	0.0608	6.6
13	0.0187	0.0470	8.5
15	0.0224	0.0560	7.1
16	0.0374	0.0935	4.3
17	0.0576	0.1440	2.8
22	0.0311	0.0780	5.1
23	0.0209	0.0520	7.7
24	0.0273	0.0680	5.9
25	0.0285	0.0710	5.6
26	0.0334	0.0840	4.8
27	0.0315	0.0790	5.1
34	0.0423	0.1060	3.8
35	0.0139	0.0348	11.5
Amostra (Clorofórmio)	g de extrato	g/ml de extrato	1 mg/ml (µl)
1	0.0296	0.0740	5.4
5	0.0376	0.0940	4.3
6	0.0406	0.1015	3.9
7	0.0459	0.1150	3.4
8	0.0310	0.0780	5.1
9	0.0355	0.0880	4.5
10	0.0276	0.0690	5.8
11	0.6420	0.1610	2.5
12	0.3530	0.0880	4.5
13	0.0251	0.0630	6.3
15	0.0374	0.0940	4.3
16	0.0300	0.0750	5.3
17	0.0421	0.1050	3.8
22	0.0299	0.0750	5.3
23	0.0271	0.0678	5.9
24	0.0140	0.0350	11.4
25	0.0258	0.0645	6.2
26	0.0310	0.0775	5.3
27	0.0591	0.1500	2.7
34	0.0299	0.0750	5.3
35	0.0288	0.0720	5.6

Amostra (Etil Acetato)	g de extrato	g/ml de extrato	1 mg/ml (µl)
1	0.0363	0.0908	4.4
5	0.0271	0.0678	5.9
6	0.0336	0.0840	4.8
7	0.0428	0.1070	3.7
8	0.0319	0.0798	5.0
9	0.0219	0.0548	7.3
10	0.0425	0.1063	3.8
11	0.0470	0.1175	3.4
12	0.0194	0.0485	8.2
13	0.0341	0.0853	4.7
15	0.0285	0.0713	5.6
16	0.0618	0.1545	2.6
17	0.0131	0.0328	12.2
22	0.0459	0.1148	3.5
23	0.0486	0.1215	3.3
24	0.0380	0.0950	4.2
25	0.0439	0.1098	3.6
26	0.0404	0.1010	4.0
27	0.0804	0.2010	2.0
34	0.0633	0.1583	2.5
35	0.0446	0.1115	3.6

## Anexo B

Tabela contendo as reações de inibição entre os extratos e frações de extratos e as bactérias testadas. (+): Inibe; (-): Não inibe.

		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Ficus polita</i>	Metanol	-	-	-	-
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	+	-	-	-
	F4	-	-	-	-
	F5	-	-	-	-
<i>Trichilia prieuriana prieiruana</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	+	-	+	-
	Etil acetato	+	-	+	-
	FWI	-	+	-	-
	FWII	-	+	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	-	+	-	-
	F3	+	+	+	+
	F4	+	+	+	+
	F5	-	+	+	-
<i>Margaritaria discoidea</i>	Metanol	-	-	+	+
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	+	-	+	+
	FWI	-	+	-	-
	FWII	-	+	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	-	+	-	-
	F3	+	+	+	+
	F4	+	+	+	+
	F5	+	+	+	+
<i>Psychotrya peduncularis</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	-	-
	Etil acetato	+	-	+	-
	FWI	+	+	+	+
	FWII	-	+	-	-
	F1	+	+	+	+
	F2	+	+	+	+
	F3	+	+	+	+
	F4	+	+	+	+
	F5	+	+	+	-
<i>Combretum micrantum</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	-	-

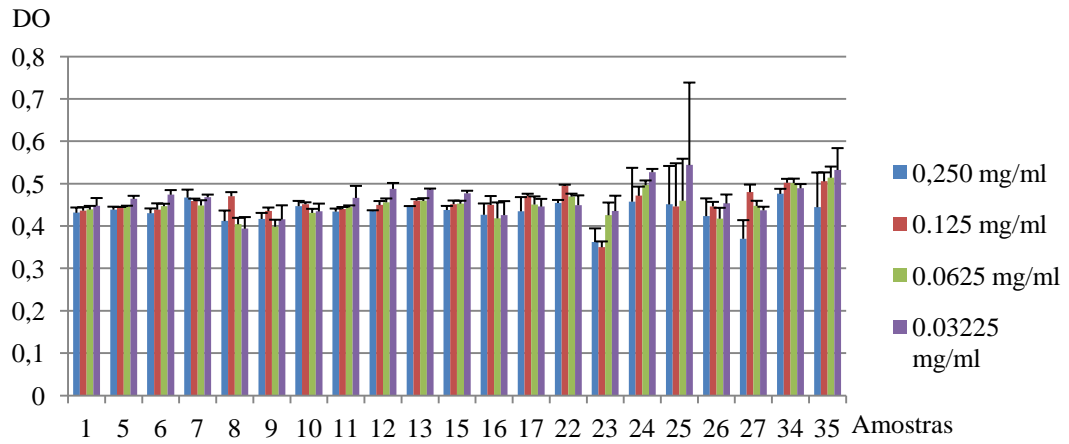
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	+	-	-
	FWII	-	+	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	+	+	+	+
	F3	+	+	+	+
	F4	+	+	+	+
	F5	-	-	-	-
<i>Zanthoxylum lepreuri</i>	Metanol	-	-	-	-
	Clorofórmio	+	-	-	-
	Etil acetato	+	-	-	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	-	-
	F4	-	-	-	+
F5	-	-	-	-	
<i>Cassitha filiformis</i>	Metanol	-	-	-	-
	Clorofórmio	-	-	-	-
	Etil acetato	+	-	-	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	-	-
	F4	-	-	-	-
F5	-	-	-	-	
<i>Cisampelos mucronata</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	-	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	+	-	-
	FWII	-	+	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	+	-	-	-
	F3	+	+	-	-
	F4	+	+	-	+
F5	-	+	-	-	
<i>Capparis erythrocarpus</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	+	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	+	-	-
	F3	+	+	-	-
	F4	-	-	-	-
F5	-	+	-	-	

<i>Strophantus sarmentosus</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	-	-
	Etil acetato	-	-	-	-
	FWI	-	+	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	-	-
	F4	-	+	-	-
	F5	-	+	-	-
<i>Ocimum gratissimum</i>	Metanol	-	-	-	-
	Clorofórmio	+	-	-	-
	Etil acetato	+	-	-	-
	FWI	+	+	+	+
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	+	+	+	+
	F3	+	+	-	+
	F4	+	+	+	+
	F5	+	+	+	+
<i>Ocimum basilicum</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	+	-	+	-
	Etil acetato	+	-	+	-
	FWI	+	+	+	+
	FWII	-	-	-	-
	F1	+	+	+	+
	F2	-	-	-	-
	F3	+	+	+	+
	F4	+	+	+	+
	F5	-	-	-	-
<i>Abrus precatorius</i>	Metanol	-	-	-	-
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	+	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	-	-
	F4	-	-	-	-
	F5	-	+	-	-
<i>Khaya senegalensis</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	+	-	+	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	+	-

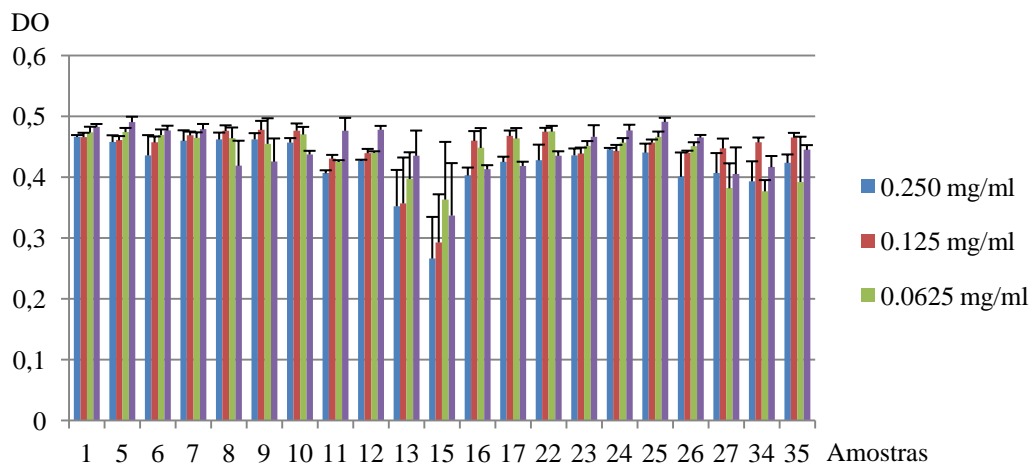
	F4	-	-	+	-
	F5	+	-	-	-
<i>Faidherbia álbida</i>	Metanol	-	-	-	-
	Clorofórmio	-	-	-	-
	Etil acetato	-	-	-	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	+	-
	F4	-	-	-	-
	F5	-	-	+	-
<i>Cnestis ferruginea</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	-	-	+
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	+	-	-	-
	F4	+	-	-	-
	F5	+	-	+	-
<i>Landolphia dulcis</i>	Metanol	-	-	-	-
	Clorofórmio	-	-	-	-
	Etil acetato	-	-	-	-
	FWI	-	-	+	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	-	-
	F4	-	+	-	-
	F5	-	+	-	-
<i>Allophylus africanus</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	+	-	+	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	-	-
	F4	-	+	-	-
	F5	+	-	-	-
<i>Hymenocardia acida</i>	Metanol	-	+	+	-
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	-	-	-

	F2	-	-	-	-
	F3	-	-	-	-
	F4	-	+	-	-
	F5	-	+	-	-
<i>Leptadenia hastata</i>	Metanol	-	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	-	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	-	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	-	+	-	-
	F3	+	+	-	-
	F4	-	+	-	-
	F5	-	+	-	-
<i>Calyptrorchilum christyanum</i>	Metanol	+	-	+	-
	Clorofórmio	-	-	+	-
	Etil acetato	-	-	+	-
	FWI	-	+	-	-
	FWII	-	-	-	-
	F1	-	+	-	-
	F2	+	+	+	+
	F3	+	+	+	+
	F4	-	+	-	-
	F5	-	+	-	+

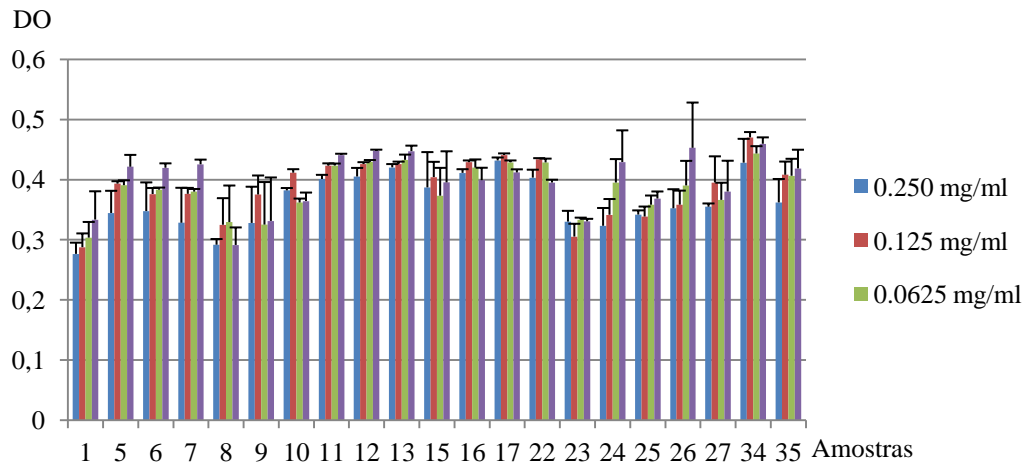
## Anexo C



**Densidade ótica das células expostas às amostras extraídas com metanol.**

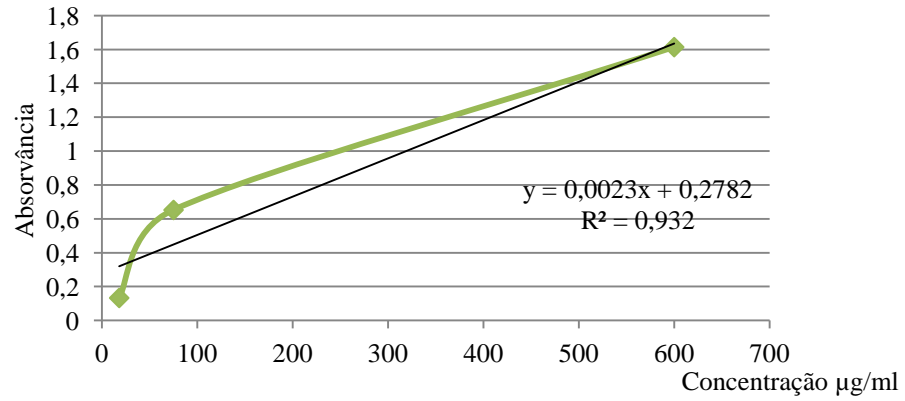


**Densidade ótica das células expostas às amostras extraídas com etil acetato.**

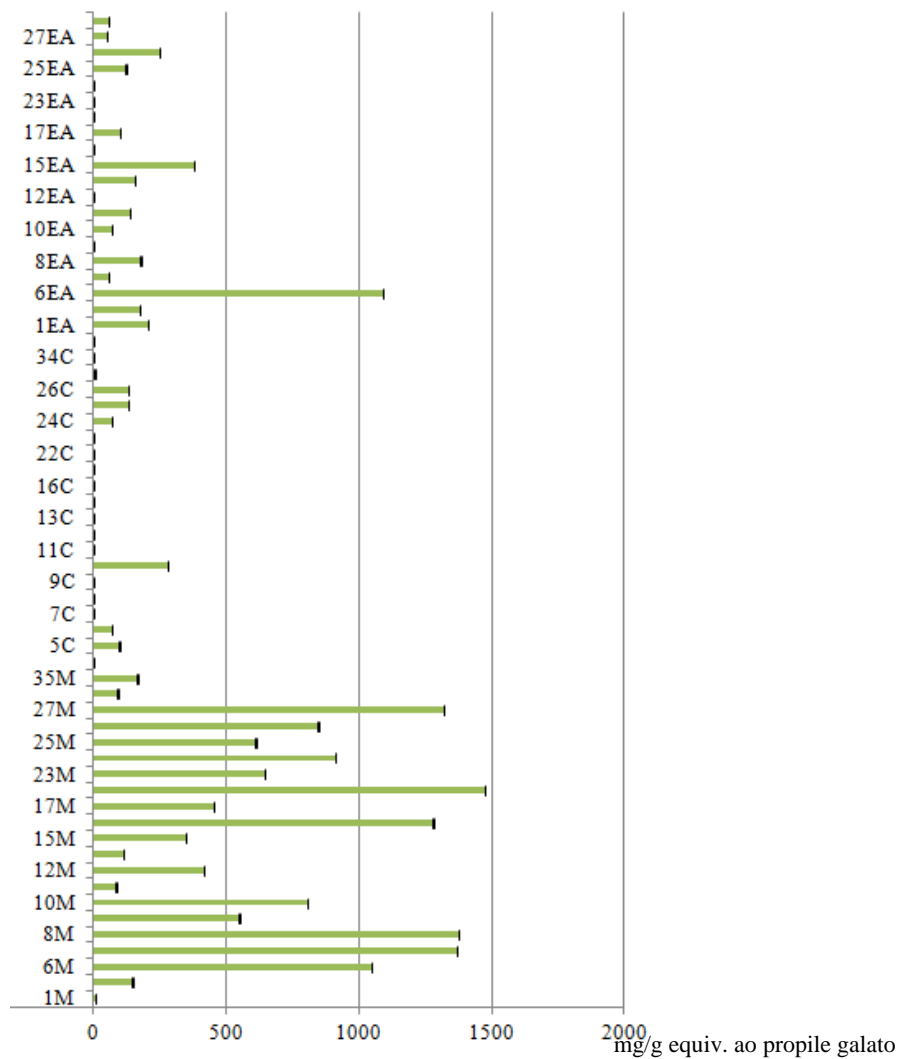


**Densidade ótica das células expostas às amostras extraídas clorofórmio.**

## Anexo D

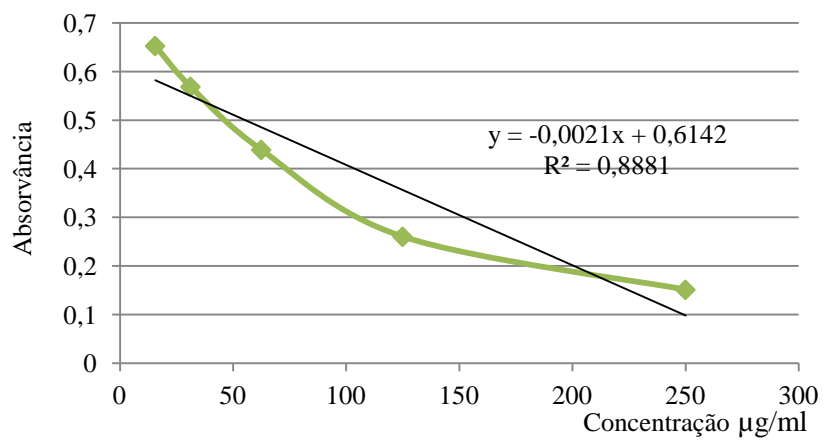


**Reta de calibração para os polifenóis utilizando o propile galacto**



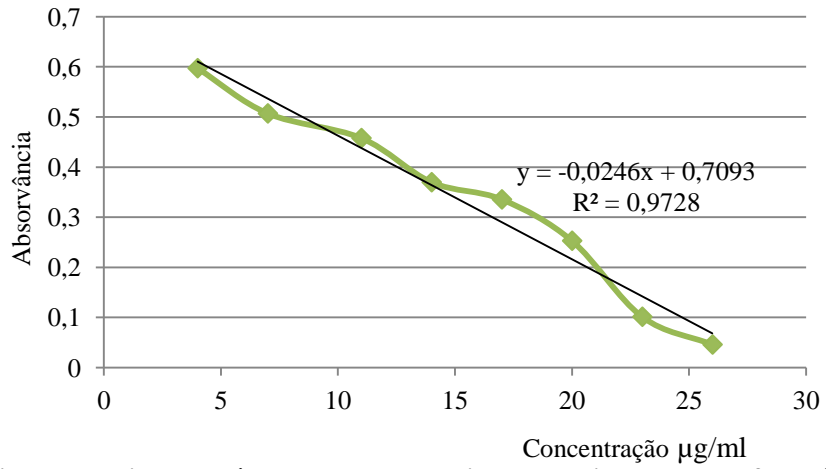
**Concentrações em mg/g equivalentes ao propile galato dos extratos vegetais diluídos a 1/5.**

## Anexo E



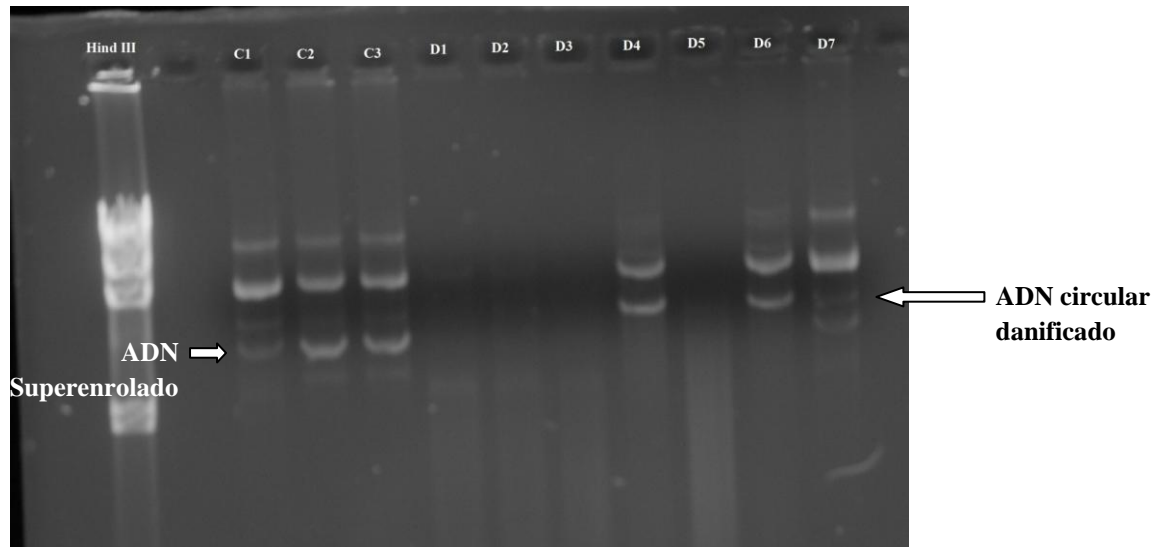
**Reta de calibração obtida através dos resultados obtidos pela leitura espectrofotométrica das placas utilizando ácido ascórbico.**

## Anexo F



**Reta de calibração obtida através dos resultados obtidos pela leitura espectrofotométrica das placas utilizando ácido ascórbico.**

## Anexo G



Primeiro gel obtido após corrida das reações testadas para obtenção da concentração ideal de ácido ascórbico para a reação final (Tabela V e VI). C1: DNA+H<sub>2</sub>O+Reagente de Fenton, C2:DNA+ H<sub>2</sub>O +NaHCO<sub>3</sub>, C3:DNA+ NaHCO<sub>3</sub> com FeCl<sub>3</sub>; D1: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico (16µM); D2: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico (8µM); D3: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico (4µM); D4: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico (2µM); D5: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico (1µM); D6: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico (0.5µM); D7: DNA+ Reagente de Fenton +Ác. Ascórbico (0.25µM).