

Cláudia Valente

2019

**FRACIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA GUINÉ-BISSAU**





**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**
DESDE 1902



**UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA**

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

**FRACIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS DA GUINÉ-BISSAU
COM ATIVIDADE BIOLÓGICA**

CLÁUDIA HEITOR DE MATOS CHAMBEL VALENTE

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA

Julho, 2019



**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**
DESDE 1902



**UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA**

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

**FRACIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS DA GUINÉ-BISSAU
COM ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Autor: Cláudia Heitor de Matos Chambel Valente

Orientadora: Professora Doutora Olga Matos

Co-orientador: Investigador Auxiliar Fernando Cardoso

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre no ramo da Parasitologia Médica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Olga Matos e coorientação científica do Investigador Auxiliar Fernando Cardoso.

Julho, 2019

Dedicatória

Dedicado à ciência

"Na Natureza nada se perde, nada se cria, tudo se transforma."

Lavoisier (Pai da Química Moderna, séc. XVIII)

Dissertação escrita de acordo com o novo acordo ortográfico

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao Pedro, meu marido, e aos meus pais, por me apoiarem e incentivarem a nunca desistir dos meus projetos. O meu muito obrigado, por todo o carinho e amor incondicional!

À minha orientadora, Professora Doutora Olga Matos, agradeço a possibilidade de realização deste projeto e a sua constante disponibilidade, incentivo e preocupação para o sucesso do mesmo. O meu muito obrigada!

Ao Investigador Fernando Cardoso, como coorientador deste trabalho, agradeço toda a confiança em mim depositada e todo o apoio científico prestado neste projeto. O meu muito obrigada, pela disponibilidade inegável e pelo entusiasmo constante na coorientação deste trabalho. Terá sempre o meu reconhecimento!

A todo o Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, agradeço o acolhimento e a providência das condições necessárias à realização de todo o projeto.

Agradeço ainda ao Doutor Luís Catarino do *Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes* (cE3c), da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, e ao Professor Bucar Indjai do Instituto Nacional de Estudos e Pesquisa Educacionais Anísio Teixeira (INEP) da Guiné-Bissau, as plantas enviadas e utilizadas neste projeto, sem as quais seria impossível a realização deste projeto.

Às minhas colegas de mestrado, Catarina Monteiro, Filipa Peixoto e Inês Santos, agradeço o companheirismo, todas as palavras de incentivo e de descontração ao longo desta etapa. O meu sincero obrigada!

À minha grande amiga Lina Chambel, agradeço todo o seu carinho, força, encorajamento e amizade verdadeira, estendo o meu mais profundo agradecimento. *Swásthya* ॐ!

E ainda aos meus amigos Joana e Pedro Catarino pelo apoio incondicional, por todas as palavras de incentivo e por toda a disponibilidade inegável.

A todos o meu muito obrigada!

Resumo

Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse na utilização de plantas e dos seus princípios ativos no campo da medicina com a pesquisa de novos fármacos.

Neste trabalho foram testadas 22 plantas medicinais da Guiné-Bissau, com o objetivo de fracionar e identificar os extratos de plantas com atividade biológica (antibacteriana, antiparasitária e quimiopreventiva) contra microrganismos patogénicos.

O metanol foi utilizado principalmente como solvente de extração nas 22 plantas que deram origem a 29 amostras incluindo folhas, ramos, cascas e raízes. Além deste solvente de extração foram utilizados mais quatro solventes para fazer o fracionamento, nomeadamente, isopropanol, acetona, clorofórmio e éter nas 29 amostras de plantas. Estas amostras foram testadas em cinco microrganismos: *Escherichia 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 e 3T3, de modo a determinar a sua atividade citotóxica. A quantidade de polifenóis e a capacidade antioxidante dos extratos também foram estudados.

Os resultados obtidos foram analisados, avaliando-se quais os extratos das espécies de plantas que demonstravam atividade antibacteriana, anti-parasitária (anti-*T. gondii*) e quimiopreventiva.

Com este estudo, a principal observação foi que os extratos das espécies de plantas: *Abrus precatorius*, *Diospyros heudelotii* e *Zanthoxylum leprieuri* foram os que demonstraram atividade antibacteriana e boa atividade antioxidante, embora tenham apresentado toxicidade nas células VERO e 3T3 para as concentrações estudadas. Concluiu-se que, no futuro, estes extratos poderão ter forte potencial, para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Extrato, bactérias, *Toxoplasma gondii*, metanol, plantas medicinais da Guiné-Bissau.

Abstract

In the last decades, there has been a great interest in the use of plants and their active principles in the field of medicine with the research of new drugs.

In this work, 22 medicinal plants from Guinea-Bissau were tested, with the objective of fractionating and identifying extracts of plants with biological activity (antibacterial, antiparasitic and chemopreventive) against pathogenic microorganisms.

Methanol was used primarily as extraction solvent in the 22 plants that gave rise to 29 samples including leaves, branches, barks and roots. In addition to this extraction solvent, four other solvents to do the fractionation, namely isopropanol, acetone, chloroform and ether were used in the 29 plant samples. Their action was observed against five microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Toxoplasma gondii*, in order to determine the existence of antibacterial and antiparasitic activity. The extracts were also tested on Vero and 3T3 cells in order to determine their cytotoxic activity. The amount of polyphenols and the antioxidant capacity of the extracts were also studied.

The results obtained were analyzed, evaluating the extracts of the plant species that showed antibacterial, anti-parasitic (anti-*T. gondii*) and chemopreventive activity.

In the present study, the extracts of the plant species *Abrus precatorius*, *Diospyros heudelotii* and *Zanthoxylum leprieuri* showed antibacterial activity and good antioxidant activity, although they showed toxicity in VERO and 3T3 cells for the concentrations studied. It was concluded that in the future these extracts may have a strong potential for the development of new drugs.

Keywords: Extract, bacteria, *Toxoplasma gondii*, methanol, medicinal plants of Guinea-Bissau.

Índice Geral

1	Introdução	1
1.1	A utilização das plantas medicinais ao longo da história do mundo.....	1
1.2	Guiné-Bissau e o uso de plantas medicinais	4
1.3	As plantas medicinais e o desenvolvimento de fármacos	7
1.4	O papel metabólico das plantas.....	12
1.4.1	Alcalóides	14
1.4.2	Compostos Fenólicos.....	15
1.4.2.1	Flavonóides.....	17
1.4.3	Terpenos.....	18
1.5	Métodos utilizados na caracterização das plantas	19
1.5.1	Extração de compostos bioativos.....	19
1.5.2	Caracterização dos extratos vegetais	20
1.5.2.1	Metodologias fitoquímicas	21
1.5.2.2	Metodologias Químicas.....	22
1.5.2.2.1	Quantificação de Polifenóis.....	22
1.5.2.2.2	Atividade de Óxido nítrico	23
1.5.2.3	Metodologias Biológicas	24
1.5.2.3.1	Microrganismos Procarióticos.....	25
1.5.2.3.2	Microrganismos Eucarióticos	27
1.5.2.3.2.1	Protozoário: Toxoplasma gondii.....	28
1.5.2.3.3	Células Animais.....	33
1.6	Justificação do trabalho de investigação e seus objetivos.....	36
2	Material e métodos.....	38
2.1	Obtenção das plantas medicinais	39
2.2	Extração e produção da biblioteca de compostos	40
2.3	Avaliação dos extratos vegetais quanto à sua composição em polifenóis	43
2.4	Avaliação dos extratos vegetais quanto à atividade de óxido nítrico.....	44
2.5	Avaliação da atividade dos extratos vegetais em bactérias.....	45

2.5.1	Estirpes bacterianas usadas nos ensaios.....	45
2.5.2	Cultura das estirpes bacterianas	46
2.5.3	Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana em meio sólido	46
2.5.4	Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana em meio líquido	47
2.6	Avaliação da atividade dos extratos vegetais em células animais	48
2.6.1	Linhagem celular	48
2.6.2	Avaliação da viabilidade celular	49
2.7	Avaliação dos extratos vegetais no <i>Toxoplasma gondii</i>	50
2.8	Análise de dados	51
3	Resultados	52
3.1	Obtenção da biblioteca de extratos	52
3.2	Análise do ensaio qualitativo dos extratos vegetais em bactérias.....	55
3.3	Análise da composição em polifenóis dos extratos vegetais	63
3.4	Análise da redução da atividade do óxido nítrico	66
3.5	Determinação da CMI para as cinco estirpes bacterianas	68
3.6	Atividade dos extratos vegetais em células animais	70
3.7	Ação dos extratos vegetais em <i>Toxoplasma gondii</i>	71
4	Discussão	74
4.1	Determinação da suscetibilidade bacteriana aos extratos em meio sólido e líquido	74
4.1.1	Em meio sólido	74
4.1.2	Em meio líquido.....	77
4.2	Composição dos extratos vegetais testados em polifenóis e óxido nítrico	77
4.3	Ensaio de citotoxicidade em células animais	79
4.4	Atividade anti - <i>Toxoplasma gondii</i>	79
5	Conclusão	82
	Referências Bibliográficas.....	84
	Anexos.....	99
	Anexo 1	100

Anexo 2	109
Anexo 3	112
Anexo 4	117

Índice de figuras

Figura 1 - Alguns dos curandeiros da Guiné-Bissau (imagem adaptada Indjai <i>et al.</i> , 2010).....	4
Figura 2 - Algumas plantas medicinais guineenses: 1. <i>Abrus precatorius</i> subespécie <i>africanus</i> ; 2. <i>Calyptrochilum christyanum</i> ; 3. <i>Capparis erythrocarpus</i> ; 4. <i>Cassytha filiformis</i> ; 5. <i>Cnestis ferruginea</i> ; 6. <i>Ficus polita</i> ; 7. <i>Hymenocardia acida</i> ; 8. <i>Psychotria peduncularis</i> (imagem adaptada do Indjai <i>et al.</i> , 2010)	5
Figura 3 - Ramos com flores e frutos de <i>Guiera senegalensis</i> (imagem adaptada de Indjai <i>et al.</i> , 2010).....	6
Figura 4 - Abordagem atual para a descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais (imagem adaptada Pan <i>et al.</i> , 2013).....	8
Figura 5 - Etapas para o desenvolvimento de um novo fármaco (imagem adaptada de Balunas & Kinghorn, 2005).....	10
Figura 6 - Metabolismo primário de uma planta comum (imagem adaptada de IBRA, 2018).....	13
Figura 7 - A origem dos metabolitos secundários provenientes do metabolismo primário da planta (imagem adaptada de Gárcia & Carril, 2009)	14
Figura 8 - Estrutura da quinina $C_{20}H_{24}O_2N_2$ ou $C_{20}H_{24}N_2O_2$, exemplo de um alcalóide com núcleo quinoleína (imagem adaptada de PubChem, 2018).....	15
Figura 9 - Estrutura do Ácido Gálico $C_7H_6O_5$ (imagem adaptada de PubChem, 2018)	16
Figura 10 - Estrutura da quercetina $C_{15}H_{10}O_7$ exemplo de um flavonóide (imagem adaptada de PubChem, 2018)	17
Figura 11 - Estrutura da molécula Isopreno: C_5H_8 ou 2-Metil-1,3-butadieno (imagem adaptada de PubChem, 2018)	18
Figura 12 - Fluxograma de Padronização: Extração à identificação de fitocompostos bioativos (imagem adaptada de Drugtime, 2018).....	21
Figura 13 - Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> . O ciclo de vida deste microrganismo inclui duas fases: a fase de reprodução sexuada (A) e a fase de reprodução sexuada (B). (imagem adaptada do CDC, 2018).....	29
Figura 14 - Fluxograma da metodologia aplicada no presente estudo	38
Figura 15 - Ilha da Guiné-Bissau: mapa do Parque Nacional de Orango (imagem adaptada Indjai <i>et al.</i> , 2010).....	39
Figura 16 - Demonstração da aplicação das amostras na microplaca (imagem adaptada de Silva, 2014)	48
Figura 17 - Biblioteca de extratos obtidos da Guine Bissau descritos na tabela das plantas	54
Figura 18 - Processo de extração com solventes orgânicos através da resina Diaion HP-20	54
Figura 19 - a) Biblioteca de extratos fracionados. b) Alguns dos extratos fraccionados: F4, F5, F6, F7, F8, F9 e F10.	55
Figura 20 - Exemplo de halos de inibição da placa inoculada com <i>S. aureus</i> :1) Halo de inibição dos extratos em metanol; 2) Halo de inibição do Controlo positivo e negativo.....	55

Figura 21 - Exemplo de halos de inibição da placa inoculada com <i>B. cereus</i> pelo extrato da raiz da planta <i>Zanthoxylum leprieuri</i> (1) e <i>P. aeruginosa</i> pelo extrato da folha da planta <i>Zanthoxylum leprieuri</i> (2), <i>E. faecalis</i> pelo extrato do ramo da planta <i>Abrus precatorius</i> (3) e <i>E. coli</i> pelo extrato da folha da planta <i>Sarcocephalus latifolius</i> (4).....	56
Figura 22 - Microplaca com a reação dos extratos ao reagente Folin-Ciocalteau.....	64
Figura 23 - Curva de calibração para determinar a concentração de polifenóis (mgEPG/g)	65
Figura 24 - Teor de fenóis em mgEPG/g dos extratos em metanol das plantas da Guiné-Bissau após 2h; $\pm$ SD	66
Figura 25 - Curva de calibração para avaliar o NO	67
Figura 26 - Avaliação de extratos como antioxidantes, capturando o radical NO; $\pm$ SD.....	67
Figura 27 - Reação dos extratos à bactéria <i>S. aureus</i> após a aplicação da resazurina ao fim de 3 horas.	68
Figura 28 - Percentagem de células VERO viáveis após exposição às amostras extraídas em metanol	72
Figura 29 – Percentagem de inibição de <i>T. gondii</i> após exposição às amostras extraídas em metanol.....	73

Índice de tabelas

Tabela 1 - Plantas medicinais da Guiné-Bissau	40
Tabela 2 - Volume de reagentes para construção da reta de calibração de propilgalato.	44
Tabela 3 - Concentração do inóculo usado em cada bactéria teste.....	46
Tabela 4 - Rendimento do extrato vegetal após extração com metanol	52
Tabela 5 - Classificação da estirpe bacteriana na presença de extratos em metanol e extratos fraccionados	57
Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória dos extratos metanólicos frente a microrganismos padrão.....	69
Tabela 7 - Concentração em mg/ml de extrato capaz de inibir as células VERO e 3T3 (IC ₅₀).....	70
Tabela 8 - Registo da reação de inibição, do diâmetro dos halos de inibição e classificação da estirpe bacteriana na presença de extrato em metanol e extratos fraccionados	101
Tabela 9 - Polifenóis diluição 1:10	110
Tabela 10 - Determinação da actividade de inibição a partir da leitura de absorvâncias a 546nm	113
Tabela 11 - Determinação do IC ₅₀ (µg/ml) de acordo com a sua actividade de inibição	115
Tabela 12 - Inibição dos extratos em células VERO e IC ₅₀	118
Tabela 13 - Inibição dos extratos em células 3T3 e IC ₅₀	122

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

α - alfa
 β - beta
 γ - gama
% - percentagem
a. C. - antes de Cristo
Abs. - Absorvância
Ac. - anticorpos
acetil- CoA - Acetil- Coenzima A
ADME - absorção, distribuição, metabolização, excreção
AMEA - Agência Europeia de Validação do Medicamento
B. cereus - *Bacillus cereus*
BHA - hidroxianisol butilado
BHT - hidroxitolueno butilado
°C - grau *Celsius*
C - átomos de carbono
Ca - casca
 Ca^{2+} - íão cálcio
CAT - catalase
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMI - Concentração Mínima Inibitória
 CO_2 - dióxido de carbono~
d. C. - depois de Cristo
DME - meio *Dulbecco's Modified Eagles*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - ácido desoxirribonucleico
DO - densidade óptica
E. coli - *Escherichia coli*
E. faecalis - *Enterococcus faecalis*
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FCR - Reagente Folin-Ciocalteu

FW - Fração *Water*

Fo - folha

h - hora

H₂O - molécula da água

HCl - ácido clorídrico

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência ou *High performance liquid chromatography*

I - intermédia

IC₅₀ - índice de citotoxicidade, sendo 50% a concentração máxima inibitória

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

LC₅₀ - concentração letal-50, isto é, a concentração que um composto é letal para 50% da população exposta

kg - quilograma

km - quilómetro

McF - McFarland

meio L.B. - meio Luria Bertani

meio M-H - meio Muller-Hinton

mg - miligrama

mg/ml - miligrama por mililitro

mge - miligrama de extrato

mgEPG/g - miligrama por grama equivalentes a propilgalato

Mg²⁺ - ião magnésio

ml - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

MSA - meio Ágar-sal-Manitol

MTT - método de tetrazólio amarelo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

µl - microlitro

N - átomo de nitrogénio ou azoto

nm - nanómetro

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintetase
O - átomo de oxigénio
OMS - Organização Mundial de Saúde
P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*
PBS - Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*
PCR - *Polimerase Chain Reaction*
PG - propilgalato
PMS - metossulfato de fenazina
por ex. - por exemplo
R - resistente
Ra - ramo
RNS - espécies reativas de nitrogénio
ROS - espécies reativas de oxigénio
rpm - rotações por minuto
Rz - raiz
S - sensível
Séc. - século
S. aureus - *Staphylococcus aureus*
SIDA - Síndrome de imunodeficiência adquirida
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - solução de nitroprussiato de sódio
T. gondii - *Toxoplasma gondii*
TBHQ - terc-butil hidroquinona
TLC - cromatografia em camada fina
TMT/SMX - trimetoprim e sulfametoxazol
UE - União Europeia
UFC - unidades formadoras de colónias
U.V. - Ultravioleta
UV/VIS - Ultravioleta/Visível
VIH - vírus da imunodeficiência humana
XTT - sal tetrazólio

1 Introdução

1.1 A utilização das plantas medicinais ao longo da história do mundo

No início da evolução humana, a espécie *Homo sapiens*, alimentava-se mais de produtos de origem vegetal, nomeadamente, vegetais, frutas, tubérculos, sementes, raízes e plantas tropicais (Teles *et al.*, 2017). Eram indivíduos que viviam numa época em que o seu habitat natural eram as florestas tropicais e equatoriais e savanas, aproveitando ao máximo o que a natureza oferecia para seu sustento (Teles *et al.*, 2017). O uso de plantas como meio alimentar e/ou curativo é tão antigo como o próprio homem (Morales, 1996; Cragg & Newman, 2005).

Já o célebre Hipócrates dizia: "Que o teu alimento seja o teu medicamento".

Ao longo da sua evolução, o homem pré-histórico aprendeu a reconhecer as plantas seguras e as nocivas, através da observação, da interação Homem-plantas e animal-plantas (Klaasen *et al.*, 2001).

Há cerca de 60.000 anos, no período Neandertal, na região do Iraque apareceram os primeiros testemunhos arqueológicos de uso de plantas medicinais (MacDonald, 1995; Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2013;). Plantas como *Achillea millefolium* (milefólio), *Centaurea* (cardo) ou *Ephedra* (arbusto), eram colocadas junto dos mortos, não se sabendo ao certo se o faziam com o objetivo de honrar o morto ou com intuito medicinal (MacDonald, 1995).

Com o passar dos tempos, a comunicação escrita entre povos tornou-se fácil e fluída, começou-se a estabelecer e a sistematizar o conhecimento botânico para fins medicinais. Exemplos disso foram as tábuas de argila suméricas, de à 5.000 anos antes de Cristo (a. C.), onde constava textos sobre medicina, o livro de Pen Tsao de origem chinesa que continha 11.111 preparações à base de produtos do reino vegetal (2.500 a. C.) e papiros egípcios de Edwin Smith (2600 a. C.) divulgado em 1873 por George Ebers, em que Imhotep (médico egípcio) extraia os "remédios" das plantas, hoje em dia, conhecidos por princípios activos (MacDonald, 1995; Gurib-Fakim, 2005; Sykes, 2009; Petrovska, 2012; Vargas *et al.*, 2012). Ali foram descritas a utilização terapêutica de cerca de 700 plantas (Lima, 2010). Em 1600 a. C., Susruta Samhita, médico indiano descreveu 760

plantas, integrando-as na medicina indiana: *Ayurveda* (Sournia, 1992; Lima, 2010; Saini, 2016). Plantas como o alho, os aloés, a canela, o coentro, a noz-moscada, a pimenta, *Cannabis indica* (indutor do sono), o gengibre, a mirra e *Rauwolfia serpentina* (sedativo) foram descritas no uso em fitoterapia indiana. (Lima, 2010; Petrovska *et al.*, 2010; Petrovska, 2012)

Mais tarde, na Grécia, Hipócrates (300 a. C.) inspirado em papiros egípcios antigos combina diferentes plantas e descobre medicamentos, ficando assim conhecido como o pai da medicina (Castro, 1985; Sournia, 1992; Gurib-Fakim, 2005; Petrovska, 2012). Também, Teofrasto grande botânico da antiguidade (225 a. C.), agrupou 500 plantas e estudou o seu valor curativo (Castro, 1985; Sournia, 1992; Petrovska, 2012).

Ainda, em passagens bíblicas, no nascimento de Jesus Cristo, os Reis Magos levariam como presentes: ouro, incenso e mirra. O verdadeiro incenso e a mirra eram considerados como produtos medicinais tão valiosos como o ouro (Petrovska, 2012; DeRose, 2016).

Cerca de 20 anos depois de Cristo (d. C.), Dióscórides escreveu vários e valiosos livros sobre plantas medicinais, tendo sido mais tarde traduzidos pelo grego Laguna (1590) e com o título *De Materia Medica*, onde descreveu o uso terapêutico, botânico e diacrônico de cerca de 600 plantas (Castro, 1985; Gurib-Fakim, 2005; Lima, 2010; Petrovska, 2012). Das plantas descritas destacam-se *Salix alba* (salgueiro-branco) antecessor do ácido acetilsalicílico usado como analgésico e *Ricinus communis* (mamona) usada como purgante e *Matricaria recutita* L. (camomila) usada com anti-inflamatório (Castro, 1985; Lima, 2010).

No século II, *Claudius Galenus* (131-200 d. C.), médico-farmacêutico romano de origem grega, foi um entusiasta na utilização do ópio como analgésico (Sournia, 1992; Lima, 2010; Petrovska, 2012). A sua influência foi tal que ainda hoje fala-se de farmácia galénica.

Ao longo de mais de mil anos, estes ensinamentos baseados em documentos e livros ancestrais foram a base do conhecimento sobre plantas medicinais, até ao período do Renascimento (MacDonald, 1995). Neste período, *Paracelso* (1493-1541) afirmou que as plantas tinham na forma a indicação terapêutica, introduziu o láudano (constituído por vinho, ópio, canela, açafrão, etc.) que se divulgaria pela Europa (Sournia, 1992;

Lima, 2010; Petrovska, 2012). Contudo na época dos descobrimentos, os portugueses Amato Lusitano e Garcia de Orta e outros médicos e naturalistas trouxeram da Ásia, África e América plantas e práticas médicas para a Europa, que muito engrandeceram a terapêutica Ocidental (Castro, 1985; Lima, 2010; Cunha *et al.*, 2017). Em 1563, Garcia de Orta escreveu o "Colóquio dos simples e drogas da Índia", uma das mais importantes obras publicadas na Europa, onde descreve as plantas e as respectivas propriedades medicinais (Lima, 2010; Cunha *et al.*, 2017).

Somente nos finais do século XVIII, o uso de fitofármacos foi aceitável, cientificamente, isolando e estudando metabolitos especiais. As primeiras substâncias químicas foram isoladas a partir de extratos vegetais, por separação e identificação de ácidos orgânicos: oxálico, tartárico e málico (Almeida, 2011).

Já no início do séc. XIX até meados do séc. XX, substâncias bioativas como a narcotina e a morfina a partir do ópio, quinina da chinchona, cafeína, salicina e digitalina foram identificadas e sintetizadas quimicamente (Foglio *et al.*, 2006; Lima, 2010; Cunha, 2014;). Estas descobertas levaram a um desenvolvimento vertiginoso, com produção atual de cerca de 50% dos medicamentos de origem sintética e cerca de 25% de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese (Foglio, *et. al*, 2006; Viegas Jr. *et al*, 2006; Filho *et al.*, 2010).

Ao longo do séc. XX e início do atual, foram feitos diversos estudos sobre as plantas medicinais, avaliando-se a sua eficácia através de remoção dos princípios ativos das plantas medicinais por procedimentos químicos, como alcalóides e glicosídeos. (Cunha, 2014). Também se verificou que extratos puros atuavam mais rapidamente mas não tinham um efeito tão prolongado nem completo, como a própria planta, propondo métodos de estabilização em plantas medicinais frescas, principalmente naquelas com componentes instáveis (MacDonald, 1995; Petrovska, 2012).

Cada vez mais, é feita investigação sobre o uso medicinal e efeitos tóxicos em plantas usadas com fins medicinais por povos primitivos, afim de melhorar os cuidados de saúde em toda a população mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial ingere com alguma regularidade plantas medicinais (Camejo - Rodrigues *et al.*, 2003; Cragg e Newman, 2005; Lima, 2010; Cunha, 2014).

1.2 Guiné-Bissau e o uso de plantas medicinais

Guiné-Bissau pertence ao grande continente africano, onde se utiliza mais a medicina tradicional. Em África, principalmente na África Tropical, ao contrário dos continentes asiático e europeu, a descrição da riqueza medicinal das plantas é exígua em documentação e registos escritos. Ainda existem poucos estudos científicos comprovados nestas regiões, sendo praticada uma medicina tradicional puramente empírica. Este tipo de medicina tem muito o cunho dos curandeiros (Figura 1), denominando-se assim de "folk medicine" (Silva *et al.*, 2011; Romeiras *et al.*, 2012). Estes aplicam tratamentos de forma a equilibrar a parte emocional e social do doente e posteriormente a parte física, sempre com o auxílio das plantas medicinais, as quais são prescritas de acordo com os sintomas descritos pelos doentes (Gurib-Fakim, 2005; Indjai *et al.*, 2010; Abdullahi, 2011). A passagem deste conhecimento faz-se por via oral às gerações seguintes ou familiares (Diniz *et al.*, 2008; Indjai *et al.*, 2010). No entanto, poucos são os curandeiros que detêm conhecimentos aprofundados sobre propriedades curativas das plantas.



Figura 1 - Alguns dos curandeiros da Guiné-Bissau (imagem adaptada Indjai *et al.*, 2010)

As principais enfermidades tratadas pelos curandeiros são: dores de cabeça, dores corporais, dores de dentes, diarreia, obstipação, infertilidade feminina, parto, falta de leite para amamentação, impotência sexual masculina, infeções, inflamações, febre, tosse, gripe, malária, picadas, mordeduras, envenenamentos e hipertensão (Indjai *et al.*, 2010).

De acordo com a sintomatologia da pessoa o curandeiro recorre a um ou vários tipos de plantas para proceder ao processo de cura. Alguns exemplos de plantas (Figura 2) que se destacam mais na medicina tradicional são *Abrus precatorius*, *Calypetrochilum christyanum*, *Capparis erythrocarpus*, *Cassytha filiformis*, *Cnestis ferruginea*, *Ficus polita*, *Hymenocardia acida*, *Psychotria peduncularis*, entre outras (Indjai *et al.*, 2010).



Figura 2 - Algumas plantas medicinais guineenses: 1. *Abrus precatorius* subespécie *africanus*; 2. *Calypetrochilum christyanum*; 3. *Capparis erythrocarpus*; 4. *Cassytha filiformis*; 5. *Cnestis ferruginea*; 6. *Ficus polita*; 7. *Hymenocardia acida*; 8. *Psychotria peduncularis* (imagem adaptada do Indjai *et al.*, 2010)

Apesar da Guiné-Bissau ser um dos países mais pobres de África, é no entanto extremamente rico em vegetação, levando o seu povo a utilizá-la na medicina tradicional. Também, tem uma ampla variedade de culturas de rendimento, frutas, vegetais e tubérculos; principalmente os cajus que geram mais de 80% das receitas de exportação sendo a principal fonte de rendimento para muitas comunidades rurais. No entanto, essa riqueza vegetal, atualmente, ainda não contribuí para o comércio global de produtos naturais, devido às relações socioeconómicas existentes entre comunidade e a sua sobrevivência (Oliveira *et al.*, 1993). Segundo The World Factbook, a Guiné-Bissau é um país altamente dependente da agricultura de subsistência, das exportações de castanha de caju e de ajuda externa.

Devido ao fraco poder económico, são poucos os guineenses a recorrer à medicina oficial, havendo assim colaboração entre medicina tradicional e medicina oficial.

Jesuítas (padres e freiras católicos) e outras organizações tentam recolher, transcrever e adaptar as receitas tradicionais (Indjai *et al.*, 2010; Havik, 2016).

A nível laboratorial, algumas destas plantas usadas na medicina tradicional têm revelado propriedades farmacológicas, nomeadamente *Cryptoplepis sanguinolenta* com atividade antibacteriana contra agentes enteropatogénicos e *Staphylococcus aureus* e atividade antimalárica; *Guiera senegalensis* (Figura 3) atividade antimicrobiana contra *Neisseria gonorrhoeae*, *S. aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Giardia lamblia* e *Cladosporidium cucumerinum*; e *Terminalia macroptera* revelou atividade antibiótica contra agentes enteropatogénicos (*Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp.), *S. aureus* e *Neisseria gonorrhoeae* (Diniz *et al.*, 2008; Cunha, 2014). Alguns autores defendem que estas plantas constituem fármacos promissores a serem desenvolvidos (Diniz *et al.*, 2008; Cunha, 2014).



Figura 3 - Ramos com flores e frutos de *Guiera senegalensis* (imagem adaptada de Indjai *et al.*, 2010)

Contudo, em outros países africanos algumas plantas também estão a ser alvos de estudo e outras já têm elevado prestígio e são usadas pela população mundial (Cunha, 2014). Como exemplos de plantas africanas usadas em fármacos temos folhas de espécies do género *Aloe*, folhas ou frutos do sene de espécies do género *Cassia*, folhas de melissa (*Melissa officinalis* L.), raiz de harpagófito da espécie *Harpagophytum procumbens*, entre outras (Cunha, 2014).

1.3 As plantas medicinais e o desenvolvimento de fármacos

A descoberta de um fármaco exige a interação e união entre diferentes especialistas nomeadamente, o botânico, o antropólogo, o linguista, o médico, o químico e o farmacognosista, de forma a constituírem bases de dados fidedignas (Castro, 1985; Mukherjee *et al.*, 2010; Cunha, 2014). Estas bases de dados são fundamentais para a preservação da multiplicidade de culturas humanas e servem de ponto de partida para estudos científicos, não só na descoberta de novos fármacos, mas também nas mais diversas áreas de conhecimento (Cunha, 2014; Sales *et al.*, 2015; Mohanraj *et al.*, 2018).

O ponto de partida para o desenvolvimento científico de um fármaco é possível através de uma ciência denominada Etnobotânica (Miranda *et al.*, 2013; Cunha, 2014). Este termo surgiu em 1896 pelo botânico taxonomista norte-americano John Harshberger, quando descreveu "*os estudos sobre plantas, manipuladas pelos povos primitivos e aborígenes*" (Cunha, 2014). Esta ciência desempenha funções importantes uma vez que reúne informação acerca do uso de plantas, servindo muito rapidamente como uma importante ferramenta para a indústria farmacêutica, o que justifica os investimentos levados a cabo na área da etnobotânica, pela OMS, em regiões tropicais (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Gurib-Fakim, 2005; Cunha, 2014).

Uma das subáreas da etnobotânica é a medicina tradicional (etnomedicina), que diz respeito aos métodos tradicionais de tratamento de enfermidades que afetam a população. Por sua vez, esta integra uma outra disciplina que teve grande impacto no desenvolvimento de Farmacopeias ocidentais designada de etnofarmacologia. O termo etnofarmacologia é usado para designar " estudos científicos, bem como inventariação das práticas tradicionais de preparação e uso de medicamentos à base de plantas usadas no tratamento das doenças em povos indígenas e, ainda outros estudos, nomeadamente, fitoquímicos guiados por bioensaios" (Gonçalves, 2011; Cunha, 2014) demonstrado na Figura 4.

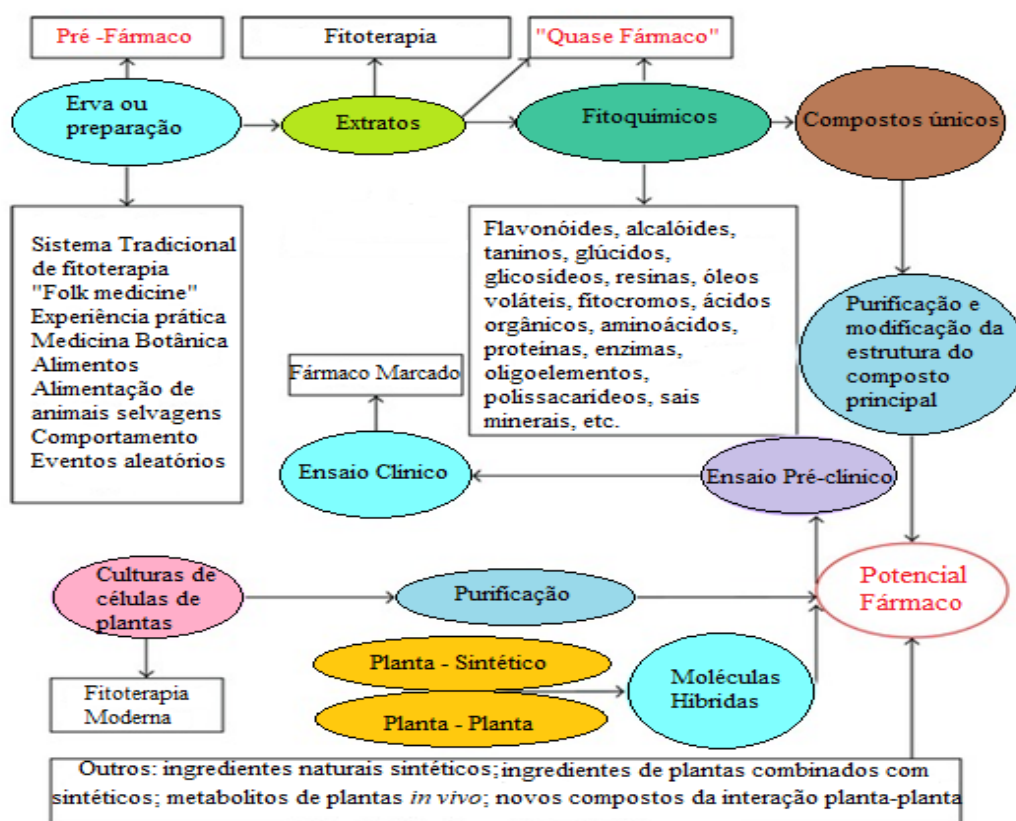


Figura 4 - Abordagem atual para a descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais (imagem adaptada Pan *et al.*, 2013)

No fim do séc. XIX, muitos dos estudos etnofarmacológicos efetuados levaram à obtenção de novas moléculas químicas (farmacognosia) que foram introduzidas como fármacos na medicina ocidental durante o séc. XX (Foglio *et al.*, 2006; Cunha, 2014). Exemplos importantes são o alcalóide quinina isolado da casca de *Chinchona officinalis* L. com ação antimalárica; o alcalóide tubocurarina isolado de lianas do género *Chondrodendron tomentosum* com ação relaxante muscular em anestesia; e o alcalóide reserpina isolado a partir de raízes de *Rauvolfia serpentina* com ação hipotensora (Cunha, 2014).

A Farmacognosia, termo introduzido em 1815 por Seydler, é a ciência que estuda matérias-primas naturais, que podem ser obtidas dos vegetais, animais, ou por fermentação a partir de microrganismos (fungos, bactérias), que possuem atividade farmacológica (Mukherjee *et al.*, 2010; Cunha, 2014).

No caso de matérias-primas vegetais, são reconhecidas como plantas medicinais aquelas que possuem atividade farmacológica, de interesse e uso na terapêutica, mesmo que não estejam inscritas nas Farmacopeias e, ainda aquelas que possuem metabolitos que a indústria farmacêutica extraia e transforme por semi-síntese em moléculas com atividade farmacológica, podendo depois incluir em medicamentos (Cunha, 2014).

Nesse sentido a farmacognosia tem dado um contributo valioso ao estudar a composição e normas de qualidade de muitos produtos vegetais em povos de cultura diferente dos europeus (Cunha, 2014; Cunha *et al.*, 2017).

Contudo, além da qualidade também é importante garantir a segurança em relação a efeitos tóxicos desse fármaco no organismo. Nesse sentido, a farmacologia, que consiste em estudar os efeitos dos fármacos no organismo, terá que estudar a dosagem, a toxicidade, os efeitos secundários, interações, contraindicações, mutagenicidade, entre outros, e também efetuar ensaios farmacológicos e experimentação clínica, que demonstrem eficácia do medicamento (Balunas & Kinghorn, 2005; Pan *et al.*, 2013; Cunha, 2014).

O ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos começa na descoberta da planta medicinal (Figura 5) na medicina tradicional, recorrendo a inquéritos etnobotânicos (Indjai *et al.*, 2010; Romeiras *et al.*, 2012; Cunha, 2014). Escolhida a planta, esta deve ser identificada taxonomicamente e deve ser realizada uma pesquisa bibliográfica sobre estudos químicos e farmacológicos que possam já ter sido feitos sobre essa espécie, género ou família.

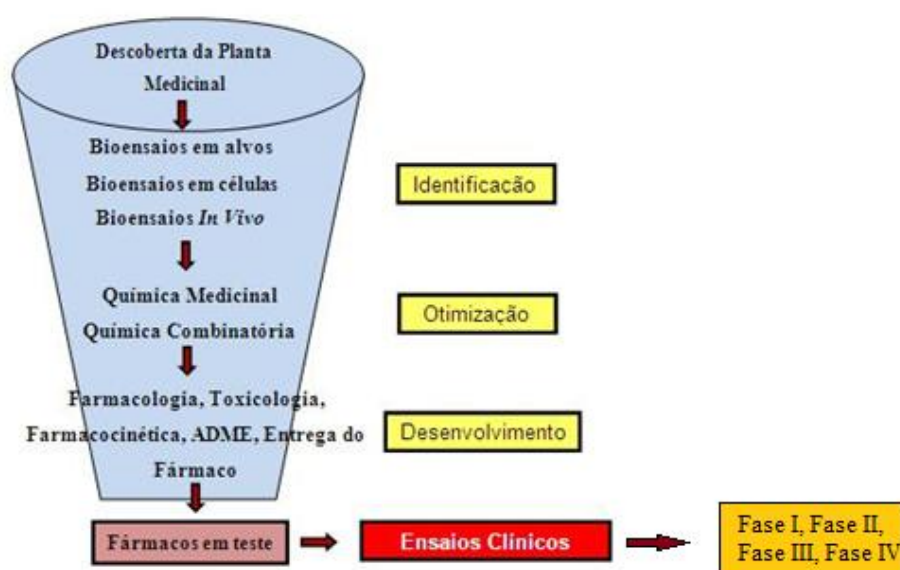


Figura 5 - Etapas para o desenvolvimento de um novo fármaco (imagem adaptada de Balunas & Kinghorn, 2005)

Como as plantas são caracterizadas por uma multiplicidade de constituintes químicos, o próximo passo a ser realizado será a prospeção química preliminar, uma vez que determina um grupo químico ou ação farmacológica. No caso de haver indicações de ação farmacológica, tentar-se-á orientar a investigação para o isolamento do(s) composto(s) a partir da obtenção dos extratos vegetais - pesquisa fitoquímica (Foglio *et al.* 2006; Pan *et al.*, 2013). A obtenção dos extratos vai servir para se efetuarem testes farmacológicos gerais e testes de toxicidade (aguda e subaguda). A partir da obtenção dos extratos, serão realizados diferentes tipos de bioensaio, a fim de identificar a presença de compostos ativos. Todos estes processos são bastante demorados uma vez que requerem isolamento e caracterização dos compostos ativos (Gonçalves, 2011; Cunha, 2014). Após este longo processo, e encontrada a substância ativa é importante otimizá-la (modificar sinteticamente a estrutura-guia) através da química medicinal e combinatória com o objetivo de aumentar a potência e a seletividade e diminuir a toxicidade. O passo seguinte é o desenvolvimento do fármaco - Farmacologia (fase de ensaios biológicos pré-clínicos e a fase clínica, esta já realizada em seres humanos).

A fase farmacêutica compreende estudos sobre o modo de administração e o controlo de estabilidade do composto na forma farmacêutica, tendo em conta a constituição química bem como o efeito farmacológico (Gonçalves; 2011; Cunha, 2014).

A fase de ensaios biológicos pré-clínicos corresponde a estudos farmacocinéticos, toxicológicos e farmacodinâmicos pré-clínicos *in vivo* (animais, órgãos ou tecidos isolados, sistemas enzimáticos, culturas de células, culturas bacterianas ou virais, etc.) do composto. Com os estudos farmacocinéticos avalia-se o seu modo de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) (Balunas & Kinghorn, 2005; Pan *et al.*, 2013).

Os estudos toxicológicos servem para avaliar o risco de toxicidade de um composto para o ser humano, de forma que quando administrado seja seguro revelando confiança. Segundo *Paracelsus* "nenhuma substância é veneno por si", "a dose correta diferencia um veneno de um remédio, de um fármaco" (Klaassen *et al.*, 2001).

Com os estudos farmacodinâmicos pretende-se estabelecer relações dose-efeito, duração e perfil dos efeitos colaterais dos produtos em análise, o que permite igualmente conhecer o mecanismo de ação em relação ao efeito pesquisado (Gonçalves, 2011; Cunha, 2014).

A farmacologia clínica é realizada em seres humanos. Esta etapa corresponde a um conjunto de ensaios de forma a comprovar o interesse terapêutico do medicamento, de forma eficaz e segura e compreende quatro fases distintas e sucessivas que têm por objetivo (Gonçalves, 2011; Cunha, 2014):

- Fase I: verificar se o fármaco é seguro, em indivíduos saudáveis, em número reduzido, indo confirmar os efeitos da dose, biodisponibilidade, posologia, toxicidade, etc.;
- Fase II: avaliar a eficácia e a toxicidade do medicamento com curtos tratamentos em indivíduos com a doença em estudo;
- Fase III: testar num maior número de doentes, com tratamentos mais prolongados, para verificar a segurança e eficácia do tratamento, de forma a estabelecer a menor dose eficaz. Os resultados destes estudos são comparados estatisticamente com os obtidos com um placebo e com um composto de atividade semelhante;

- Fase IV: monitorizar riscos e benefícios a longo prazo - farmacovigilância.

Neste sentido, tem-se vindo a assistir um crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e dos respetivos extratos na terapêutica, constituindo uma ajuda nos cuidados primários de saúde e um excelente complemento terapêutico na medicina clássica (Firmo *et al.*, 2011; Cunha, 2014).

Atualmente, a OMS e a União Europeia (UE) através da Agência Europeia de Validação do Medicamento (AMEA) têm emitido diretrizes e criado legislação para medicamentos à base de plantas. Presentemente, 80% dos medicamentos anticancerígenos, antimicrobianos, com ação cardiovascular e imunossuppressores são de origem vegetal (Pan *et al.*, 2013; Cunha, 2014). Mais de 50% de todos os fármacos usados na clínica médica são derivados de produtos naturais e seus derivados (Gurib-Fakim, 2005; Ferreira *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2013).

1.4 O papel metabólico das plantas

À semelhança dos humanos, as plantas dependem de processos metabólicos. Estes dividem-se em dois grupos: metabolitos primários e metabolitos secundários.

O metabolismo primário nas plantas (Figura 6) corresponde a um conjunto de processos químicos que são essenciais à biologia da planta tais como, fotossíntese, glicólise, ciclo do ácido cítrico, síntese de aminoácidos, transaminação, síntese de proteínas, enzimas e coenzimas, síntese de materiais estruturais, duplicação do material genético, reprodução de células, absorção de nutrientes, entre outros. Os metabolitos envolvidos no metabolismo primário são as proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácido nucleico e clorofila (Pereira & Cardoso, 2012).

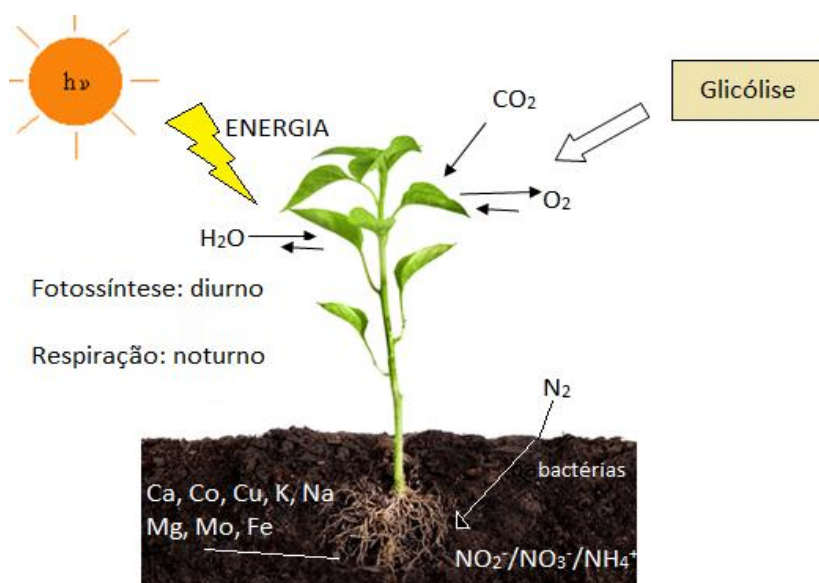


Figura 6 - Metabolismo primário de uma planta comum (imagem adaptada de IBRA, 2018)

O processo fotossintético dá lugar aos ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs. A partir do ciclo de Krebs e da via da glicólise derivam os metabolitos secundários (Wink, 2010).

O metabolismo secundário é também bastante importante originando compostos químicos únicos, não sendo universal para uma dada espécie ou família, desempenhando funções vitais para as plantas. A planta ao sintetizar estes compostos, constitui um sistema de defesa contra bactérias, fungos, vírus, alguns herbívoros e até mesmo contra outras plantas que competem por luz, água, nutrientes, e também contra a luz ultravioleta (U.V.) (Wink, 2010). Por exemplo, existem plantas que produzem fitoalexinas (atividade inibidora) contra bactérias e fungos (Fumagali *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010).

No entanto, estes compostos são alvo de investigação científica nomeadamente em estudos taxonómicos, na indústria farmacêutica na obtenção de fármacos e na indústria química para obtenção de corantes e condimentos alimentares (Wink, 2010; Júnior *et al.*, 2011).

Ainda, é de salientar que a descoberta de novos compostos tem sido uma mais valia na localização de novas moléculas para a produção de novos fármacos (Gurib-Fakim, 2005; Wink, 2010; Júnior *et al.*, 2011).

Devido à sua complexidade, os metabolitos secundários são divididos essencialmente em três grandes grupos: alcalóides, compostos fenólicos e terpenos (Alvarenga e Melo, 2005; García & Carril, 2009; Wink, 2010).

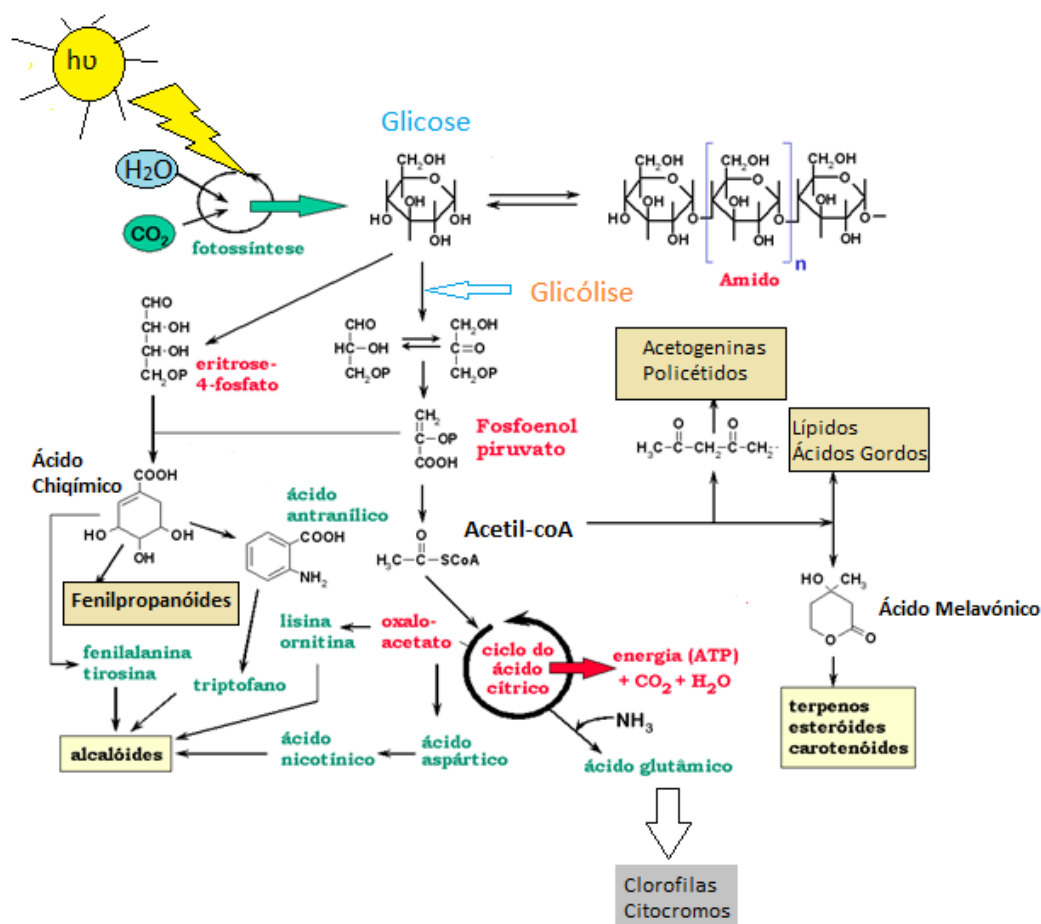


Figura 7 - A origem dos metabolitos secundários provenientes do metabolismo primário da planta (imagem adaptada de García & Carril, 2009)

1.4.1 Alcalóides

O termo alcalóide foi proposto por Wilhelm Meissner no século XIX, aplicando-se a compostos básicos de origem natural (Cabral *et al.*, 2014; Cunha, 2014).

Nas plantas, os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se em seguida nos vacúolos, e desse modo não aparecem nas células jovens (Cunha, 2014).

Os alcalóides formam um grupo heterogêneo de compostos orgânicos cíclicos, contendo um nitrogênio (átomo N) num estado de oxidação negativa, com distribuição limitada em organismos vivos. A sua origem biogenética é normalmente a partir de aminoácidos, mas existem outros alcalóides que derivam de terpenos e esteróis. Os alcaloides têm grande atividade farmacológica ou toxicológica. A presença destes metabolitos secundários no organismo, possui acentuado efeito no sistema nervoso, provocando efeitos alucinogêneos ou atuando como um veneno (Cunha, 2014).

Como grandes exemplos, temos a morfina como principal alcalóide do ópio obtido das cápsulas da *Papaver somniferum* L. , com ação sedativa e hipotensora, a codeína e narceína também extraída do ópio com atividade antitússica; alcalóides da quina obtidos a partir da casca do gênero *Cinchona*, nomeadamente, a quinina (Figura 8), com ação antimalárica, e a quinidina, que é um regulador do ritmo cardíaco em arritmias; a colchicina com ação antigotosa; a vimblastina e vincristina provenientes da espécie *Catharanthus roseus* com ação antitumoral (Duarte, 2005; Cunha, 2014).

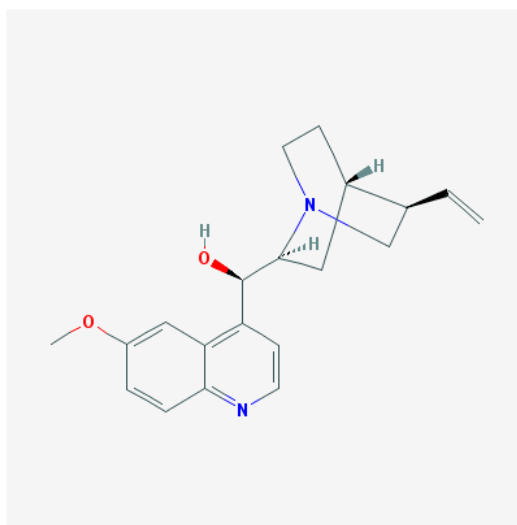


Figura 8 - Estrutura da quinina $C_{20}H_{24}O_2N_2$ ou $C_{20}H_{24}N_2O_2$, exemplo de um alcalóide com núcleo quinoleína (imagem adaptada de PubChem, 2018)

1.4.2 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são todas as estruturas que possuem pelo menos um núcleo benzênico com um ou mais hidroxilos, livres ou então podem fazer parte de éteres,

ésteres ou heterósidos. Isto significa que não sendo azotados têm ciclo ou ciclos aromáticos e derivam principalmente do metabolismo do ácido chiquímico e/ou de um poliacetato (Efraim *et al.*, 2011; Martins, 2012; Cabral *et al.*, 2014).

Como compostos fenólicos com elevada atividade farmacológica (analgésicos, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes, vasodilatadores) destacam-se os ácidos fenólicos, os flavonóides, os taninos, os compostos cumarínicos e os compostos quinónicos. Já nas plantas a sua função é a de proteção contra herbívoros (Gurib-Fakim, 2005; Wink, 2010; Cunha, 2014). Os ácidos fenólicos derivam do ácido benzóico e do ácido cinâmicos. Exemplo disso é o ácido gálico (Figura 9), sendo um ácido fenólico, deriva do ácido salicílico estruturalmente derivado do ácido benzóico. Outro exemplo de ácido fenólico é o ácido cafeico que deriva do ácido cinâmico.

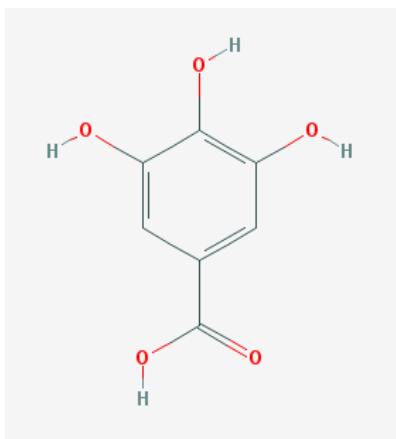


Figura 9 - Estrutura do Ácido Gálico $C_7H_6O_5$ (imagem adaptada de PubChem, 2018)

Os compostos fenólicos têm origem biossintética e derivam essencialmente de duas grandes vias anabólicas (Cunha, 2014):

- Via do ácido chiquímico: a biossíntese do ácido chiquímico faz-se a partir da condensação (molécula de H_2O) do fosfoenolpiruvato com o 4-fosfo-D-eritrose. Assim, do ácido siquímico originam-se ácidos aromáticos, nomeadamente tirosina e fenilalanina;
- Via do acetato: esta via origina ácidos β -policetometilénicos que vão dar origem a compostos fenólicos através do processo de ciclização (condensação aldónica ou reação de Claisen).

1.4.2.1 Flavonóides

Os flavonóides (Figura 10) formam um vasto grupo de metabolitos secundários com atividade biológica com inúmeras funções na natureza. Quimicamente, são moléculas de baixo peso molecular que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal, estando presentes em toda a parte aérea da planta. Visivelmente, os flavonóides são os responsáveis pela cor das flores, das folhas e da fruta, atraindo animais e o próprio ser humano. Participam no processo da fotossíntese e protegem a planta contra os efeitos dos raios UV.

Todos os flavonóides partem de uma estrutura base, a flavona (2-fenil-benzopirona). A partir da estrutura base, divergem várias moléculas dando origem a várias classes de flavonóides e compostos relacionados. Daí os flavonóides talvez sejam considerados dos principais compostos fenólicos. De acordo com a sua estrutura química, os variados flavonóides têm diferentes atividades farmacológicas. Exemplos de flavonóides, a hesperidina, a rutina e os ginkgólidos diminuem a fragilidade capilar; a quercetina diminui a motilidade do intestino delgado, tendo atividade antidiarreica (Gurib-Fakim, 2005; Cunha, 2014).

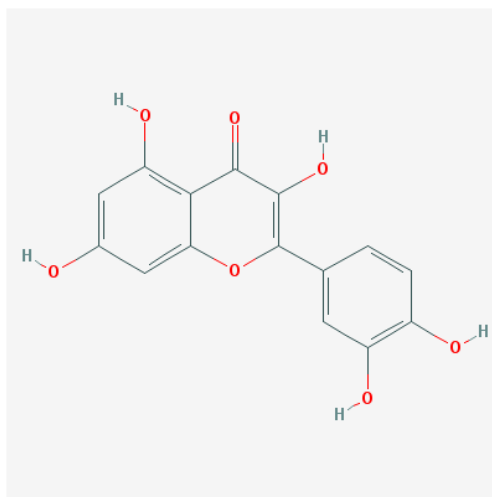


Figura 10 - Estrutura da quercetina $C_{15}H_{10}O_7$ exemplo de um flavonóide (imagem adaptada de PubChem, 2018)

Estes compostos têm atraído a atenção das ciências médica e farmacológica devido às suas propriedades antialérgicas, anticancerígenas, anti-inflamatórias,

"*benzodiazepina-like*", "*estrogénio-like*", promotores de óxido nítrico, com atividade antioxidante e anti-radicalar, entre outras (Cunha, 2014).

1.4.3 Terpenos

Os terpenos, também designados de terpenóides ou isoprenóides, são a maior grupo de metabolitos secundários de origem vegetal, e provêm maioritariamente das Gimnospérmicas e em muitas famílias das Angiospérmicas (Cunha, 2014).

Atualmente, já foram encontrados mais de 22.000 terpenóides principalmente em óleos essenciais.

Os terpenos podem ser dímeros, trímeros ou polímeros de isoprenos (Prasanthi & Lakshmi, 2012; Cunha, 2014). Os isoprenos podem formar cadeias lineares ou compostos em anel, nomeadamente os monoterpénos contendo 10 átomos de carbono (C10), sesquiterpenos com 15 átomos de carbono (C15), os diterpenos com 20 átomos de carbono e os triterpenos com 30 átomos de carbono (C30).

Geralmente, os isoprenos (Figura 11) são insolúveis em água e sintetizados a partir da acetil-Coenzima A (acetil-CoA) ou através da via do mevalonato (Hecht *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2002; Cunha, 2014).

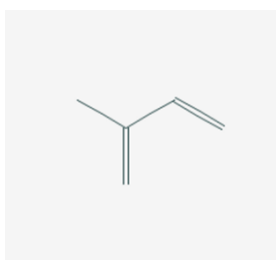


Figura 11 - Estrutura da molécula Isopreno: C_5H_8 ou 2-Metil-1,3-butadieno (imagem adaptada de PubChem, 2018)

1.5 Métodos utilizados na caracterização das plantas

1.5.1 Extração de compostos bioativos

Inicialmente o material vegetal é sistematizado taxonomicamente, devendo ser colhidos exemplares completos, incluindo pequenos ramos com folhas, flores, frutos em vários estados de desenvolvimento e a parte subterrânea (raiz), e várias amostras da mesma planta para guardar no herbário (Cunha, 2014).

Identificada e escolhida a planta que se pretende investigar em relação às suas propriedades terapêuticas, é fundamental iniciar a extração dos compostos bioativos das mesmas, após boa e rápida secagem de modo a evitar degradação pelos componentes atmosféricos ou por micróbios indesejáveis. Outra opção, é liofilizar sob vácuo as amostras de plantas, sem provocar a perda de componentes voláteis que possam exibir atividade biológica relevante. Após secagem, o material seco mantém um peso constante, podendo de seguida ser moído e adicionado um gradiente de solventes de extração. Nos processos extrativos existem várias técnicas de extração, das quais se destacam preferencialmente (Gurib-Fakim, 2005; Sasidharan *et al.*, 2011; Cunha, 2014):

- Extração a frio: o material vegetal moído é extraído com solventes, à temperatura ambiente, de diferentes polaridades. Exemplos de solventes orgânicos que podem ser usados, metanol, etanol, clorofórmio, acetona, acetato de etilo, hexano entre outros. São solventes comumente aplicados nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos diversos (Mezzomo, 2008). Atualmente, na extração a frio as extrações podem ser feitas mediante frações, ou seja, o fracionamento envolve o uso de diferentes solventes de diferentes polaridades, nem sempre a 100%, conjugando em diferentes percentagens com outros solventes, na tentativa de isolar componentes bioativos. Geralmente, a técnica de fracionamento, não é limitada a materiais vegetais, também é aplicada a microrganismos fúngicos e bacterianos. Associada a esta técnica, está a utilização de resinas. As resinas têm a capacidade de absorver grandes moléculas devido aos seus poros. O procedimento em geral, envolve a adição do extrato vegetal a estas resinas, que depois de secas são submetidas a alguns solventes de modo a extrair os

componentes faseadamente de acordo com a composição química. Um exemplo de um bom solvente é o metanol, pois faz a extração dos compostos antioxidantes (Andreo & Jorge, 2006).

- Percolação a quente: a planta é submetida à extração com um solvente em ebulição, geralmente sob refluxo. Este método permite a extração de um elevado número de metabolitos, a partir de material pouco solúvel ou insolúvel como ceras usadas em produtos naturais lipofílicos.
- Extração em Soxhlet: é o mais usado em processos industriais ou quando se parte de quantidades superiores a 20kg de plantas. Utilizando um extrator a quente tipo Soxhlet, o solvente é aquecido em balão de fundo redondo, e o vapor formado passa para o condensador sendo refrigerado, passando ao estado líquido. O solvente vai arrastando os compostos solúveis da amostra. Completada a extração, o agente de extração de grandes volumes é concentrado sob vácuo e, se for de pequenos volumes, é conservado sob azoto, assegurando que os produtos voláteis não sejam perdidos. Os extratos aquosos são normalmente liofilizados e armazenados a -20°C, reduzindo a degradação dos produtos naturais bioativos.

O procedimento mais comum utilizado pelos curandeiros da Guiné para obtenção do extrato pretendido são descasca, trituração com pilão, decoção e a maceração (Indjai *et al.*, 2010), podendo ser adicionado a esses extratos um gradiente de solventes de extração.

É importante salientar, que tanto a validação etnobotânica como a extração dos compostos devem ser feitas por profissionais experientes de modo a obter-se uma correta extração dos compostos bioativos. Esta é a fase mais importante de todo o processo, para não haver perda dos componentes ativos. A sua execução tem que ser rigorosa.

1.5.2 Caracterização dos extratos vegetais

Após a obtenção do extrato, tanto puro como fracionado, é importante verificar a sua atividade biológica através de métodos de bioensaio caracterizando deste modo os seus compostos bioativos através de metodologias fitoquímicas, bioquímicas ou biológicas.

1.5.2.1 Metodologias fitoquímicas

A análise fitoquímica serve para conhecer os constituintes químicos das plantas ou conhecer o grupo de metabolitos secundários relevantes nas mesmas, através do fracionamento químico dos produtos. De acordo com o metabolito que se pretende isolar (Sasidharan *et al.*, 2011), assim é baseada a escolha do solvente orgânico (Figura 12). A grande vantagem do fracionamento é obtenção mais rápida de material biologicamente ativo (Cunha, 2014).

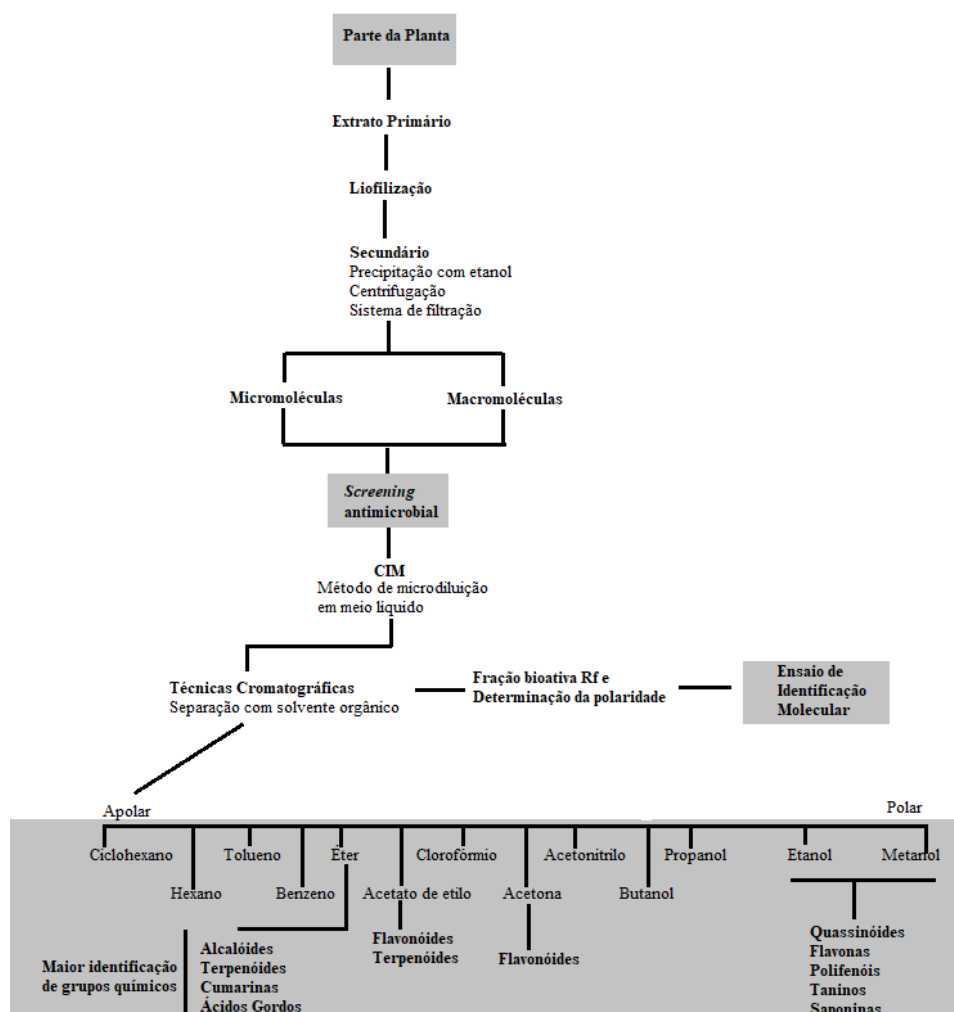


Figura 12 - Fluxograma de Padronização: Extração à identificação de fitocompostos bioativos (imagem adaptada de Drugtime, 2018)

Neste tipo de metodologia as técnicas mais usadas para identificação de moléculas químicas ou metabolitos secundários são: cromatografia em camada fina (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estas técnicas têm sido uma mais valia, para identificar novas moléculas ou metabolitos secundários presentes nas plantas para a produção de novos medicamentos (Gurib-Fakim, 2005; Sasidharan *et al.*, 2011).

1.5.2.2 Metodologias Químicas

As metodologias químicas para além de identificar compostos químicos servem também para a compreensão dos mesmos. Neste caso, a presença de compostos químicos poderá indicar qual a sua atividade e reação perante a exposição a organismos vivos. Dois exemplos de ensaios químicos para verificar e quantificar a presença de alguns compostos químicos são o ensaio dos polifenóis (Magalhães *et al.*, 2010) e o ensaio do óxido nítrico (Ho *et al.*, 2010) através de métodos espectrofotométricos.

1.5.2.2.1 Quantificação de Polifenóis

Os polifenóis são um grupo de compostos químicos encontrados em diversas plantas, frutos e vegetais caracterizados por um ou mais anéis fenólicos. Os polifenóis são responsáveis por inúmeros benefícios para a saúde humana pois além de serem excelentes antioxidantes têm também atividade anti-inflamatórias, antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticancerígena. São fundamentais na prevenção de algumas doenças, melhorando as funções fisiológicas, metabólicas e ainda atuam na modulação intracelular e extracelular.

Na extração de polifenóis os agentes de extração normalmente utilizados são solventes orgânicos, tais como metanol, etanol e acetona (Ignat *et al.*, 2011; Khoddami *et al.*, 2013).

A determinação do teor de polifenóis totais é normalmente efetuada através do método de Folin-Ciocalteu em microplacas de 96 poços (Zhang *et al.*, 2006). É um método bastante simples, rápido e de baixo custo que se baseia na oxidação dos polifenóis e

redução do reagente Folin-Ciocalteu (FCR), que é uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato, resultando um complexo de cor azul proporcional à concentração de polifenóis. A reação entre os compostos fenólicos e o FCR ocorre em meio alcalino ($\text{pH} \approx 10$). Nestas condições alcalinas, ocorre a desprotonação dos grupos hidroxilo da molécula dos polifenóis e a consequente libertação de elétrons, levando à redução do reagente FCR. A reação colorimétrica de oxidação-redução de cor azul tem um máximo de absorção a 760 nm no espectrofotómetro Ultravioleta-visível (UV/VIS) (Singleton *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005). O elevado número de interferentes (por ex. o ácido ascórbico) é considerado uma grande desvantagem deste método (Everette *et al.*, 2010). No entanto, a grande vantagem dos polifenóis é que podem evitar reações de oxidação-redução por meio da quelação de íons de cobre e de ferro, catalizando *in vivo* a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS) (Nakamura *et al.*, 2013).

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados habitualmente nos alimentos são os compostos fenólicos como BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), TBHQ (terc-butil hidroquinona), e PG (propilgalato), tendo como função capturar os radicais livres, absorventes de oxigénio e quelantes (Coneglian *et al.*, 2011).

Atualmente, algumas modificações ao método original têm sido propostas para aumentar a seletividade do mesmo, contudo o método original continua a ser o mais usado, sendo considerado o método de referência (Sanchez-Rangel *et al.*, 2013).

1.5.2.2.2 Atividade de Óxido nítrico

Atualmente, existe um elevado consumo de plantas, usadas como agente terapêutico devido às suas propriedades antioxidantes, principalmente por doentes com cancro. Daí a importância de quantificar espectrofotometricamente a atividade anti-radicalar e antioxidantes em constituintes fenólicos. As vitaminas C e E, β -caroteno e alguns compostos fenólicos têm sido os principais meios de oposição aos radicais livres (Coneglian *et al.*, 2011).

O poder antioxidante dos extratos vegetais foi analisado segundo a metodologia da captura do radical livre - óxido nítrico (NO).

O método por solução aquosa de nitroprussiato de sódio (SNP) gera espontaneamente NO, que interagindo com a molécula de oxigénio produz iões nitrito, reagindo na presença do reagente de Griess, medindo espectrofotometricamente UV/VIS (Balakrishnan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012; Neto *et al.*, 2013). Assim, o reagente de Griess baseando-se na reação de diazotização deteta a presença de compostos de nitrito, usando a sulfamida e o diclorato de N-(1-naftil)-etilenodiamina em condições ácidas (ácido fosfórico). Para detetar a atividade do NO no extrato de planta é adicionado SNP e após um determinado tempo de incubação é adicionado o reagente de Griess, medindo de imediato a absorvância (Abs.) da reação obtida. Como padrão de referência recorreu-se ao ácido ascórbico, calculando a atividade NO através da seguinte fórmula (Ho *et al.*, 2010):

$$\% \text{ atividade} = [(Abs. \text{ controlo} - Abs. \text{ amostra}) / Abs \text{ controlo}] * 100$$

1.5.2.3 Metodologias Biológicas

As metodologias biológicas compreendem testes *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, num estudo de investigação a prioridade são os testes *in vitro*, usando culturas de células animais e microrganismos procarióticos e eucarióticos. A grande característica das células animais consiste na ausência de uma parede celular rígida, tornando-as mais vulneráveis e sensíveis a variações de osmolaridade, tensão de corte devido à agitação e danos causados pelo colapso de bolhas gasosas devido ao arejamento em sistemas reacionais. Os microrganismos geralmente estudados em testes *in vitro* para análises farmacológica dos extratos são bactérias, fungos, protozoários e vírus.

A aplicação de ensaios *in vitro* é abrangente, nomeadamente serve para testar novos fármacos e verificar a sua citotoxicidade, determinar se um certo composto é bioativo sobre um microrganismo, podendo, ainda, fornecer respostas sobre a sua atividade *in vivo*. No entanto também existem outros métodos alternativos, para estudos toxicológicos usando outro tipo de organismo, por exemplo crustáceos: *Artemia salina*,

com a finalidade de substituir os ensaios com animais (testes *in vivo*) (Rogero *et al.*, 2003; Gurib-Fakim, 2005; Valgas *et al.*, 2007; Barth *et al.*, 2017).

1.5.2.3.1 *Microrganismos Procarióticos*

Os microrganismos procarióticos são seres unicelulares, muito simples. O DNA não está envolto por uma membrana, não há núcleo definido pela membrana nuclear e podemos encontrar ribossomos dispersos no citoplasma, responsáveis pela síntese proteica, e plasmídeos que são moléculas circulares de DNA. Externamente à membrana plasmática destas células, há a parede celular. Exemplo de microrganismos procarióticos são as bactérias, cianofíceas, micoplasmas, rickettsias e clamídias. O maior grupo de microrganismos procarióticos utilizados em bioensaios são as bactérias. As bactérias apresentam uma grande diversidade morfológica: esférica (coco) ou em bastonete (bacilo). Outra característica bastante importante é a coloração de Gram, permitindo dividir as bactérias em dois grupos: bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas.

Em bioensaios, é costume usarem-se várias estirpes bacterianas de referência recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) devido à sua especificidade, nomeadamente, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros.

Atualmente, em bioensaios existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais. O mais conhecido e usado é o método de difusão em agar para determinar a concentração mínima inibitória (CMI), isto é, determinar a menor quantidade de substância que é necessária para inibir o crescimento do microrganismo em teste (Ostrosky *et al.*, 2008; Lagnika *et al.*, 2011).

A determinação da CMI é relevante na medida em que ressalta aspetos toxicológicos e microbiológicos dos compostos naturais ou suas combinações (Ostrosky *et al.*, 2008; Barth *et al.*, 2017).

O método de difusão em agar é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância bioativa em meio de cultura sólido e relaciona-se o

tamanho, em milímetro (mm), do halo de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com uma concentração definida (Rogerio *et al.*, 2003; Ostrosky *et al.*, 2008).

A avaliação é feita normalmente frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e o halo de inibição de crescimento é medido partindo-se da circunferência do poço, até onde há crescimento de microrganismos (Barry *et al.*, 1991). De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, em que o diâmetro do halo de inibição é maior, igual ou não inferior a 3mm comparativamente ao controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2mm, mas inferior a 3mm em relação ao controle positivo; e resistentes, diâmetro do halo é igual ou menor que 2mm (Ostrosky *et al.*, 2008). Como controle positivo, emprega-se um antibiótico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos.

Dentro do método de difusão em placas com agar este pode envolver a aplicação de discos, cilindros de aço inoxidável ou perfuração em agar. Esta última técnica consiste na remoção do meio de cultura sólido para se formarem poços, com cerca de 6-8mm, nos quais se aplicam as substâncias a serem analisadas (Ostrosky *et al.*, 2008).

Um outro método muito utilizado em bioensaios é o método de diluição em meio. Este consiste na relação entre a proporção de crescimento do microrganismo em meio líquido e a concentração da substância em teste. Este método emprega duas metodologias: macro e microdiluição (Ostrosky *et al.*, 2008).

A microdiluição envolve testes em tubo de ensaio. A microdiluição utiliza microplacas de 96 poços, nos quais é aplicada uma determinada suspensão bacteriana em meio Muller-Hinton, e o extrato da planta em estudo. Posteriormente, são feitas sucessivas diluições seguindo-se incubação a 37°C durante aproximadamente 20h a 24h, sendo determinada a CMI. Geralmente, utiliza-se como indicador a resazurina, mais aplicada em condições de redução em meios de cultura. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor azul e não fluorescente) em resofurina (cor rosa e fluorescente) e por fim a dehidroresorufina (incolor) (Ostrosky *et al.*, 2008; Pombo, 2011). A presença de cor azul indica ausência de crescimento bacteriano, e de cor rosa indica crescimento bacteriano. A resazurina é empregada em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular, determinação da função mitocondrial, tendo uma correlação direta com a proliferação de organismos vivos (Rozzato, 2012).

Para determinar a CMI devem ser usadas bactérias Gram negativas e bactérias Gram positivas para não haver resultados dúbios quanto aos efeitos produzidos pelos extratos em contacto com a membrana bacteriana (Pombo, 2011; Rozzato, 2012; Silva, 2014).

1.5.2.3.2 *Microorganismos Eucarióticos*

As células eucarióticas são maiores que as procarióticas e têm uma organização celular complexa e um núcleo definido (núcleo verdadeiro) através de uma membrana nuclear (presença do material genético dentro do núcleo). Os principais grupos de microorganismos eucarióticos são fungos, algas e protozoários.

Os protozoários são microorganismos unicelulares extremamente complexos com inúmeras especificações funcionais, tais como cílios, flagelos, fotoreceptores, entre outros.

Os protozoários parasitas causam doenças nos humanos e nos outros animais, quer em países desenvolvidos quer em países em desenvolvimento. O sucesso na luta contra os parasitas e as parasitoses por eles provocadas tem sido variável.

Uma das parasitoses provocada por protozoários, existente em Portugal, é a toxoplasmose. Esta é uma doença provocada pelo parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. A toxoplasmose é uma zoonose muito comum, com distribuição geográfica mundial (Ferreira *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2014). Atualmente em Portugal, a prevalência e epidemiologia da infeção por *T. gondii* é de informação limitada, mas nos Estados Unidos da América e Reino Unido estima-se que a infeção poderá variar entre 16% e 40% (Cantos *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2002; Mitsuka-Breganó, *et al.*, 2010; Lobo *et al.*, 2017).

Atualmente, a procura de novos fármacos naturais tem suscitado interesse contra vários parasitas patogénicos para o homem, com destaque para *T. gondii*.

1.5.2.3.2.1 Protozoário: *Toxoplasma gondii*

Atualmente, a classificação taxonômica de *Toxoplasma gondii* (Levine, 1980) é a seguinte:

Super-reino - Eukaryota (Whittaker e Margulis, 1978)

Reino - Protista (Whittaker, 1977)

Sub-reino - Protozoa (Goldfuss, 1918)

Filo - Apicomplexa (Levine, 1970)

Classe - Sporozoea (Leuckart, 1879)

Sub-classe - Coccidea (Leuckart, 1879)

Ordem - Eucoccidea (Léger e Duboscq, 1910)

Sub-ordem - Eimeriina (Léger, 1911)

Família - Sarcocystidae (Poche, 1913)

Sub-família - Toxoplasmatinae (Biocca, 1957)

Gênero - *Toxoplasma* (Nicolle e Manceaux, 1909)

Espécie - *T. gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909)

T. gondii apresenta no seu ciclo de vida heteroxénico (Figura 13) uma fase sexuada e uma fase assexuada (Hecht *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2002; Prasanthi & Lakshmi, 2012). A fase sexuada ocorre no intestino delgado dos animais da família Felidae, tornando-os os hospedeiros definitivos. A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários, como o Homem e outros animais homeotérmicos (mamíferos e aves).

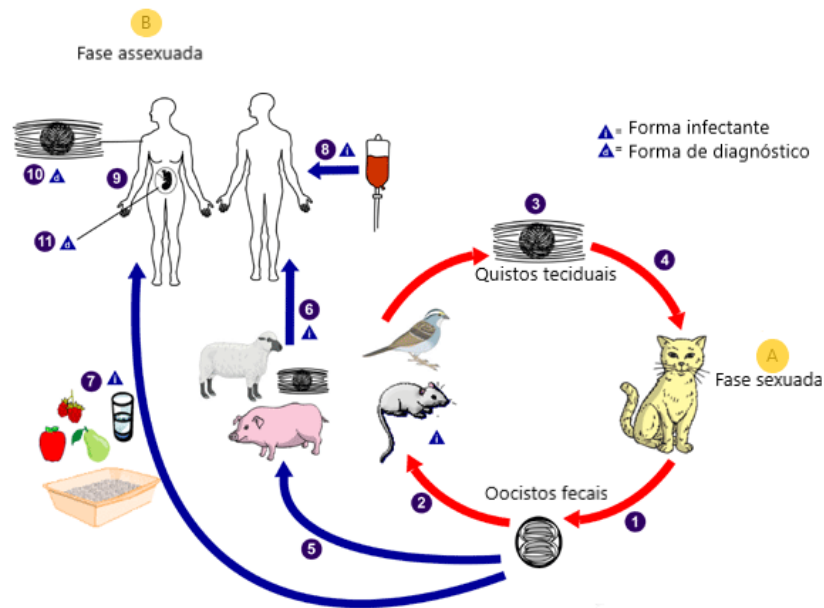


Figura 13 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. O ciclo de vida deste microrganismo inclui duas fases: a fase de reprodução sexuada (A) e a fase de reprodução assexuada (B). (imagem adaptada do CDC, 2018)

Numa fase inicial, os felídeos expulsam, através das fezes, oocistos não esporulados (número 1) em grandes quantidades para o solo. Após 1 a 5 dias, os oocistos sofrem esporulação no ambiente/solo tornando-se infecciosos. Os hospedeiros intermédios, como o Homem e outros animais homeotérmicos (mamíferos, aves e roedores) infetam-se com oocistos esporulados (número 2 e 5). No caso do ser humano esta transmissão é devida à ingestão de alimentos crus ou mal cozinhados, água, legumes, fruta ou solo contaminados, transfusão de sangue ou transplante de órgãos e ainda por via transplacentária da mãe ao feto (número 6, 7, 8 e 9). Uma vez ingeridos, os oocistos e/ou quistos tecidulares interagem com os sucos digestivos libertando os esporozoítos (libertados dos oocistos) ou os bradizoítos (libertados dos quistos tecidulares- número 3, 6 e 10), indo então alojar-se nas células do epitélio intestinal. Aí multiplicam-se rapidamente provocando a lise das células hospedeiras, diferenciando-se em taquizoítos. Estes taquizoítos podem ser detetados em células nucleadas-leucócitos, em células parenquimatosas ou a circularem livremente na corrente sanguínea. Quando dentro das células hospedeiras inibem a fusão dos lisossomas com o vacúolo parasitóforo e dividem-se até provocar a rutura celular, constituindo a fase aguda da infeção. De

seguida, passam para a fase crónica em que os taquizoítos se vão alojar principalmente em miócitos e neurónios, transformando-se em bradizoítos. Aí as células parasitárias são envolvidas por um invólucro constituindo os quistos tecidulares. Estes quistos permanecem no organismo do hospedeiro durante toda a sua vida, nomeadamente no tecido muscular, no sistema nervoso central (SNC) ou na retina, locais onde a pressão imunitária é menor.

No entanto, os gatos também podem infetar-se após o consumo de aves e roedores que tenham sido infetados com quistos tecidulares (número 4) e/ou infetados diretamente pela ingestão de oocistos esporulados.

Assim, a infeção por *T. gondii* pode ocorrer pelas seguintes vias (Ferreira *et al.*, 2002):

- ✓ Via oral: através da ingestão de oocistos provenientes das fezes dos gatos a partir do solo, da água e dos alimentos contaminados; ingestão de quistos na carne crua ou mal cozida;
- ✓ Via por contacto direto: Transfusões sanguíneas (possível contaminação), transplante de órgãos e/ou tecidos, manipulação do parasita em laboratório;
- ✓ Via congénita: transmissão transplacentária do taquizoito, possível quando a primo-infeção materna é contemporânea com a gestação.

A infeção por *T. gondii* pode apresentar, de um modo geral, três aspetos: toxoplasmose adquirida, toxoplasmose no imunodeprimido e toxoplasmose congénita.

Na maioria dos casos a toxoplasmose adquirida não causa doença grave em indivíduos imunologicamente competentes, é geralmente assintomática. Os casos sintomáticos, dão-se geralmente em pessoas com a imunidade comprometida, originando doenças graves como, linfadenopatias e hiperplasia das células reticulares (Ferreira *et al.*, 2002; Ferguson, 2009; Lisboa *et al.*, 2013).

Estima-se que esta doença afete quase um terço da população a nível mundial e que tenha vindo a aumentar nos últimos anos devido ao aparecimento de um maior número de doentes imunocomprometidos (transplantados e infetados por vírus da imunodeficiência humana [VIH]) (Amendoeira *et al.*, 2010; Câmara *et al.*, 2015).

Nestes doentes, alterações do estado mental, convulsões, distúrbios do movimento e alterações sensoriais são alguns dos sintomas evidentes (Hecht *et al.*, 2001).

Nos casos de toxoplasmose congénita, complicações graves como hidrocefalia, microcefalia e macrocefalia, calcificações intracranianas, distúrbios psicomotores ou perturbações neurológicas, podem surgir causando grande morbilidade e mortalidade. Existem outras formas clínicas de toxoplasmose congénita, que podem manifestar-se mais tardiamente após o nascimento, é o caso da coriorretinite (inflamação simultânea da retina e da coróide) (Lisboa *et al.*, 2013).

Atualmente, estão identificadas três estirpes de *T. gondii* (Hecht *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2002): Tipo I, virulenta para murganhos e associada a doentes com toxoplasmose ocular; Tipo II menos virulenta que a anterior, mas encontra-se associada à infeção crónica pela persistência de quistos tecidulares em humanos e animais da Europa e América do Norte; Tipo III, também menos virulentas que as Tipo I, comum na América do Norte e do Sul e na Europa, podendo ser encontrada nos animais e nas infeções humanas. As estirpes tipo I e II estão associadas a doentes com a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e em doentes com infeção congénita.

O diagnóstico definitivo da toxoplasmose é feito com base em exames laboratoriais. Estes exames podem ser diretos e indiretos. Os exames indiretos correspondem a testes seroimunológicos de modo a detetar e quantificar anticorpos (Ac) específicos contra *T. gondii*.

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é o mais usado no diagnóstico da toxoplasmose. É um teste imunoenzimático que se baseia em reações antigénio-anticorpo detetáveis por meio de reações enzimáticas. Este teste é útil para estabelecer o período provável de infeção: a presença de IgM anti-*T. gondii* é indicativa de infeção aguda, desaparecendo 30 dias após o início da infeção. A resposta IgG anti-*T. gondii* surge entre o 7º e o 14º dias após a infeção, mas o pico da concentração surgirá entre os 30 e os 60 dias após a infeção, persistindo ao longo da vida.

No diagnóstico direto, o parasita pode ser detetado em cortes de tecido, fixados e corados por hematoxilina-eosina, ou em biópsias (ganglionares, esplénicas e hepáticas) que após fixação são coradas com *Giemsa* (Ferreira *et al.*, 2002).

A metodologia mais usada para detetar o parasita é a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, identificando o DNA do parasita presente em amostras biológicas (líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, humor aquoso e aspirado broncoalveolar) (Ferreira *et al.*, 2002; Sasidharan *et al.*, 2011, Bamba *et al.*, 2017).

Outros testes de diagnóstico como ecografia, tomografia e ressonância magnética, constituem um grande apoio para avaliar a evolução clínica das lesões provocadas por *T. gondii* (Ferreira *et al.*, 2002; Coelho, 2010; CDC, 2018).

No que diz respeito ao tratamento da toxoplasmose, conhecem-se poucos medicamentos eficazes e, por vezes, são tóxicos nas doses estabelecidas para tratamento desta infeção. No ser humano, a terapêutica de primeira linha contra a toxoplasmose é constituída pela combinação de pirimetamina e sulfadiazina. Esta combinação irá variar de acordo com o tipo de imunidade do indivíduo assim como o tipo de toxoplasmose em questão. No caso de uma encefalite toxoplásmica a terapêutica mais usada é de facto a pirimetamina com sulfadiazina, mas para doentes que não toleram a sulfadiazina esta será substituída pela clindamicina. Outra abordagem é a combinação dos antibióticos trimetoprim e sulfametoxazol (TMP-SMX) (Bamba *et al.*, 2017), à qual, no caso da na toxoplasmose ocular, se adiciona corticóides. Segundo a OMS, o TMP-SMX é um medicamento antimicrobiano que serve para prevenir e tratar várias infeções bacterianas, fúngicas e protozooses. Este é um medicamento não patenteado e de baixo custo que está amplamente disponível em zonas com poucos recursos económicos, sendo usado como medida profilática em diferentes contextos epidemiológicos (co-infeção VIH e tuberculose ativa, co-infeção VIH e infeções oportunistas, malária e infeções bacterianas graves) e grupos populacionais (adultos, gestantes, adolescentes, crianças e bebés) (WHO, 2018). No entanto, no caso de *T. gondii*, este medicamento só atua sobre as formas de taquizoito (fase aguda da infeção), não conseguindo destruir as formas intracelulares de bradizoito (fase crónica da infeção).

Outros fármacos alternativos incluem atovaquona, azitromicina, claritromicina, 5-fluorouracil, minociclina ou doxiciclina, de forma a substituir a toxicidade da sulfadiazina ou por necessidade de recorrer à via parentérica.

De modo geral, não existe nenhum fármaco 100% eficaz e as combinações terapêuticas têm uma eficácia limitada em infecções por *T. gondii*, potenciando efeitos secundários e ocorrência de estirpes resistentes (Coelho, 2013). Um tratamento eficaz da toxoplasmose, em qualquer das suas formas, só é possível com um fármaco que, para além de ser parasiticida, contra todos os estádios parasitários do parasita, apresente baixa toxicidade. Porém, ainda não existe nenhum fármaco capaz de cumprir estes critérios.

Não existe uma vacina protetora em humanos, restando algumas medidas de prevenção da toxoplasmose humana, tais como, evitar contacto com gatos, lavar bem os alimentos crus, evitar o consumo de carne crua ou mal cozida, utilizar normas de segurança adequadas ao manipular amostras biológicas ou receber órgãos provenientes de um dador, entre outras. No entanto, na Nova Zelândia e na Europa, nomeadamente Reino Unido, França e Irlanda já é comercializada uma vacina, Toxovax® de estirpe viva atenuada S48, para controlar a toxoplasmose em ovinos e caprinos durante a gestação (Garcia *et al.*, 2014). Contudo, no ser humano esta vacina poderá tornar-se patogénica (Coelho, 2010; Garcia *et al.*, 2014).

Assim, é necessária a pesquisa de compostos naturais antiparasitários, com a finalidade de combater o parasita *T. gondii* (Jin *et al.*, 2009; De *et al.*, 2010).

1.5.2.3.3 Células Animais

A citotoxicidade é um teste preliminar *in vitro* que utiliza células animais e avalia os danos causados na célula, a formação ou não de colónias celulares e a viabilidade celular. O uso de culturas de células tem-se tornado um modelo muito apreciado e aplicado para avaliar a toxicidade dos extratos vegetais, pois são reprodutíveis, sensíveis e rápidos (Bednarczuk *et al.*, 2010).

As células animais, parte constituinte de um órgão ou tecido, em cultura, são dispersas num frasco de cultura ou placa. O crescimento das células animais é lento, apresentando tempos de duplicação de 10 a 50h (Fonseca & Teixeira, 2007). Ao longo do tempo, as células aderem à superfície sólida do frasco ou placa, crescendo em monocamada ou em

suspensão, conforme o tipo celular em estudo. Em culturas por monocamada, as células vão fixar-se no fundo da placa e de seguida propagam-se. Este é talvez o método mais usado e vantajoso tendo como pré-requisito a ancoragem, ou seja, a adesão das células no fundo dos poços da placa, permitindo assim a proliferação celular (Fonseca & Teixeira, 2007). Para haver aderência das células animais, a maioria das superfícies dos suportes de adesão são carregadas negativamente, sendo necessário glicoproteínas (gelatina, fibronectina) e/ou catiões divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}). O meio de cultura celular deverá conter os nutrientes necessários, assegurando o valor de pH fisiológico e osmolaridade adequados. O típico meio de cultura contém glucose, glutamina, aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, sais minerais e soro animal (5-20%), favorecendo a adesão das células no frasco de cultura. Alguns exemplos dessas células são fibroblastos ou células epiteliais.

Quanto à cultura de células em suspensão, as células crescem e proliferam sem aderirem à parede do frasco de cultura ou placa (independentemente da ancoragem). Por exemplo, células hematopoiéticas, células de hibridomas resultantes da fusão de linfócitos B produtores de anticorpos com células tumorais (Fonseca & Teixeira, 2007; Balakrishnan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012). Assim que houver total proliferação das células, estabelecendo contacto umas com as outras, ocorre a necessidade de proceder a sucessivas subculturas, passando estas células para outros frascos ou placas de cultura.

As células que crescem geralmente em monocamada necessitam de ser dissociadas do fundo da placa, através de uma ação enzimática (tripsina), mecânica (raspadores) ou química (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA).

Para a propagação *in vitro* e manutenção das células o meio de cultura deverá ter as condições ótimas para crescimento, nomeadamente incubação a 37°C (válido para células humanas e animais de sangue quente), pH 7,3 a 7,4, ar humidificado de 95% para evitar a perda do volume de meio de cultura por evaporação, com 5% de dióxido de carbono (CO_2) para controlo do pH através do sistema de tampão bicarbonato. O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles* (DME) suplementado com soro fetal é fundamental uma vez que assegura a estimulação celular fornecendo nutrientes, hormonas, fatores de crescimento, e proteínas (fibronectina ou colagénio), reproduzindo *in vitro* as condições *in vivo*, dos modelos animais (Fonseca & Teixeira, 2007; Singh *et al.*, 2012).

Existem células primárias, secundárias e contínuas. As células primárias propagam-se até um número limitado de divisões celulares. As células secundárias derivam de subculturas de células primárias, podendo propagar-se por umas 50 subculturas. As células contínuas ou estabelecidas têm a capacidade de se multiplicarem ilimitadamente sem inibição de contacto e com grande rapidez e derivam de tecidos tumorais ou de células primárias e secundárias que sofreram transformação (Fonseca & Teixeira, 2007; Balakrishnan *et al.*, 2009).

Em relação à sua morfologia, as células de cultura são caracterizadas em três tipos (Silva, 2014):

- ✓ Epiteliais: células achatadas e poligonais que aderem ao substrato (por ex., HeLa, Vero, HEK293, Hep G2);
- ✓ Fibroblásticas: células alongadas e bipolares que aderem ao substrato (por ex., NIH-3T3, MRC-5, L929);
- ✓ Linfoblásticas: células esféricas que não aderem ao substrato (por ex., N50, U937, YAC1).

A avaliação citotóxica dos extratos vegetais é realizada com células não tumorais de fibroblastos imortalizadas da linhagem NIH-3T3 (células extraídas de ratos albinos) e células epiteliais normais imortalizadas da linhagem Vero.

À semelhança do bioensaio em bactérias, nas culturas celulares utilizam-se também microplacas de 96 poços, aplicando uma determinada concentração de células por poço, em meio de crescimento apropriado, procedendo de seguida a sucessivas diluições a partir de uma concentração do extrato da planta. Depois de uma incubação aproximadamente de 20 a 24h, determina-se a concentração mais baixa do extrato que inibe o crescimento celular, determinando a CMI do extrato vegetal (Atindehou *et al.*, 2004; Lagnika *et al.*, 2011).

Para determinar a viabilidade e proliferação celular utiliza-se o método de tetrazólio amarelo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (Nemati *et al.*, 2013). Este é um teste colorimétrico quantitativo, fácil de ser realizado, sensível, rápido e de baixo custo (Mosmann, 1983; Liu *et al.*, 1997; Van *et al.*, 2011). Este ensaio avalia a viabilidade celular, através da atividade metabólica da mitocôndria de reduzir o sal tetrazólio, de cor amarela, em cristais formazano de cor púrpura, a nível intracelular.

A coloração púrpura é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis no ensaio. Quanto maior a intensidade da cor púrpura, maior é a quantidade de células viáveis (Galdino *et al.*, 2014).

O parâmetro final de avaliação é determinar o índice de citotoxicidade (IC_{50}), que significa a concentração do extrato que inibe 50% do crescimento celular (Jin *et al.*, 2009; Nemati *et al.*, 2013; Bulus *et al.*, 2016).

1.6 Justificação do trabalho de investigação e seus objetivos

A toxoplasmose é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em imunocomprometidos, principalmente nos seropositivos para VIH. Atualmente, a combinação de fármacos TMP-SMX é usada em imunocomprometidos em dose profilática e em dose terapêutica.

No entanto, há cada vez mais casos reportados de elevada resistência a fármacos antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários. No caso dos fármacos antiparasitários, estes são complexos, estando sujeitos a variações do hospedeiro, do parasita e dos fatores ambientais. Assim, urge a necessidade de desenvolver novos e melhores fármacos quimioterápicos para o tratamento de infeções parasitárias entre outras, para o uso da população humana.

Por outro lado, a Guiné-Bissau possui uma vegetação imensurável, usufruída pelo seu povo para fins terapêuticos. Deste modo, tem suscitado um enorme interesse investigar algumas dessas plantas medicinais de modo a determinar quais as que apresentam atividade considerada medicamentosa, podendo contribuir para a descoberta de novos fármacos.

Com o presente trabalho de investigação, pretende-se:

- Identificar em algumas plantas nativas da Guiné-Bissau, compostos biologicamente ativos em extratos e em frações;

- Testar os extratos das plantas medicinais em bactérias, parasitas e células animais, verificando a sua atividade antibacteriana, antiparasitária e a sua citotoxicidade.

2 Material e métodos

A metodologia aplicada neste trabalho está esquematizada na Figura 14 e consistiu em:

2.1 Obtenção das plantas medicinais

2.2 Extração e produção da biblioteca de compostos

2.3 Avaliação dos extratos vegetais quanto à sua composição em polifenóis

2.4 Avaliação dos extratos vegetais quanto à atividade de óxido nítrico

2.5 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em bactérias

2.6 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em células animais

2.7 Avaliação dos extratos vegetais em *Toxoplasma gondii*

2.8 Análise de dados

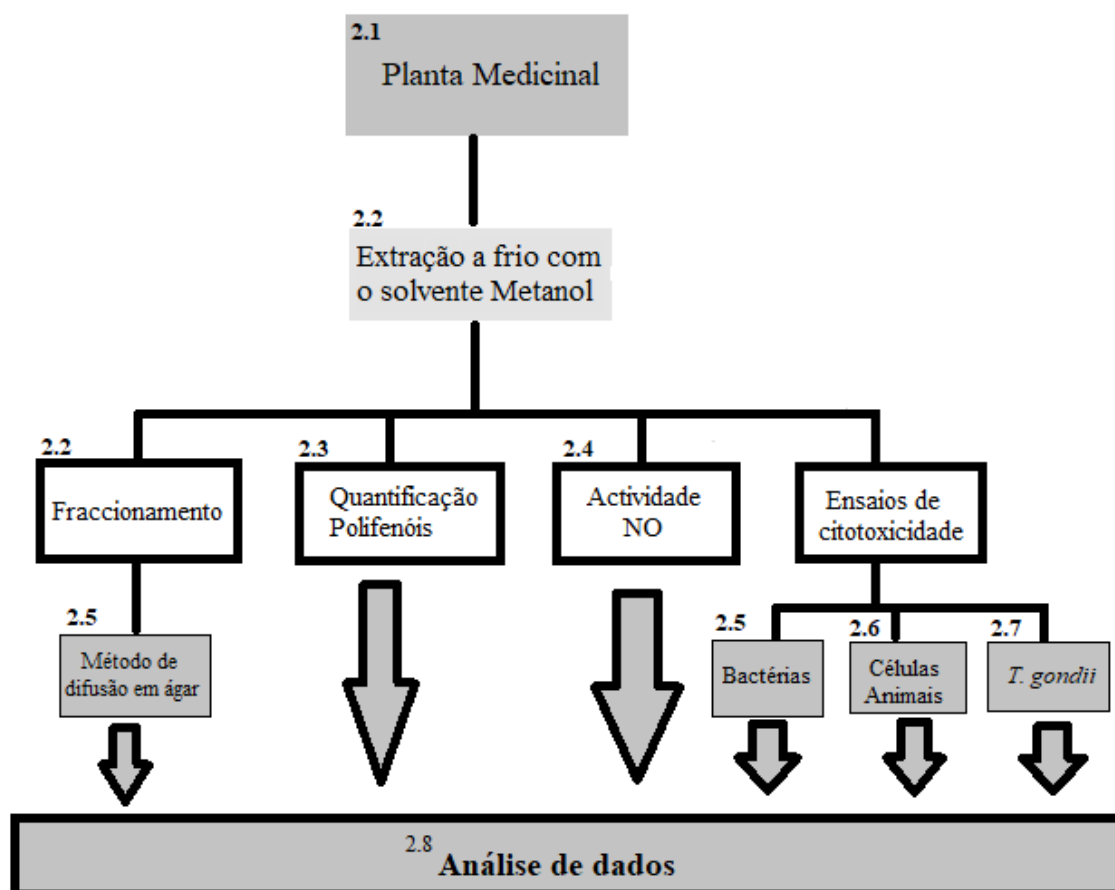


Figura 14 - Fluxograma da metodologia aplicada no presente estudo



2.2 Extração e produção da biblioteca de compostos

Após a secagem do material vegetal, foram utilizadas um total de 22 espécies de plantas (Tabela 1), dando origem a um total de 29 amostras, utilizando as seguintes partes: casca (Ca), folha (Fo), ramo (Ra) e raiz (Rz).

Tabela 1 - Plantas medicinais da Guiné-Bissau

Nº Plantas	Espécie	Nº Amostra	Parte da planta utilizada
1	<i>Ficus polita</i>	1	Folha
2	<i>Psychotrya peduncularis</i>	7	Folha
3	<i>Combretum micratum</i>	8	Folha
4	<i>Cassytha filiformis</i>	10	Ramo
5	<i>Strophanthus sarmentosus</i>	13	Ramo
6	<i>Abrus precatorius</i>	17Fo	Folha
		17Ra	Ramo
		2356Rz	Raiz
7	<i>Khaya senegalensis</i>	22	Folha
8	<i>Faidherbia albida</i>	23	Folha
9	<i>Cnestis ferruginea</i>	24	Folha
10	<i>Hymenocardia acida</i>	27	Folha
11	<i>Calyptrochilum christyanum</i>	35	Folha
		2292	Raiz
12	<i>Trichilia prieuriana</i> subespécie <i>prieuriana</i>	5/19	Folha
13	<i>Margaritaria discoidea</i>	6/29	Folha

(continuação da tabela anterior)

Nº Plantas	Espécie	Nº Amostra	Parte da planta utilizada
14	<i>Ocimum gratissimum</i>	15/37	Folha
15	<i>Allophylus africans</i>	26/32	Folha
16	<i>Leptadenia hastata</i>	33/28/34	Folha
17	<i>Zanthoxylum leprieuri</i>	2303Rz	Raiz
		2303Fo; 9/18	Folha
18	<i>Diospyros heudelotii</i>	2349Ca	Casca
		2349Fo	Folha
19	<i>Sarcocephalus latifolius</i>	2372Ca	Casca
		2372Fo	Folha
		2372Rz	Raiz
20	<i>Sorindeia juglandifolia</i>	2399Fo	Folha
21	<i>Guiera senegalensis</i>	2400Fo	Folha
22	<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	2404Fo	Folha

Cada uma das extrações das amostras de material vegetal foram realizadas em duplicado. Estas amostras foram cortadas e, pesadas e 200mg do material vegetal, foi colocado em tubos de ensaio devidamente numerados. De imediato procedeu-se à extração do material vegetal a frio e foi adicionado 10ml do solvente metanol em cada tubo com a amostra vegetal. Os tubos foram vedados convenientemente e incubados à temperatura ambiente durante três dias, ao abrigo da luz.

Na primeira série de duplicados, a solução de extração foi transferida a pouco e pouco para tubos de congelação de polipropileno de 2ml, anteriormente pesados, até o solvente evaporar completamente. Após finalizada a secagem dos extratos, os tubos foram

novamente pesados, determinando-se o peso do extrato para calcular o rendimento total do extrato obtido e também para calcular a quantidade necessária de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada extrato para a concentração de 20mg/ml, e guardados a 4°C, ficando assim a biblioteca dos extratos das plantas pronta a ser utilizada.

Assim a fórmula usada para calcular o rendimento total dos extratos foi a seguinte (Rodrigues *et al.*, 2011):

$$R_{\text{ext}} = (m_{\text{ext}}/m_{\text{mv}}) \times 100$$

Onde:

R_{ext} - Rendimento total do extrato em percentagem (%)

m_{ext} - massa do extrato seco (g)

m_{mv} - massa do material vegetal seco (g)

Na segunda série, as amostras extraídas com metanol foram sujeitas a fracionamento utilizando a resina Diaion HP-20 (Supelco). Este método consistiu em colocar 10 ml de extrato obtido por extração com metanol, em tubos de ensaio devidamente identificados com o número da amostra contendo 70mg de resina acima referida (Bugni *et al.*, 2008). Após três dias de secagem da resina, esta foi lavada por 10 soluções diferentes, havendo repetição de algumas soluções, originando na totalidade 12 frações, a cada 10 minutos. O produto da lavagem foi recolhido para tubos de congelação de polipropileno de 2ml devidamente identificados.

A ordem das soluções utilizadas na lavagem da resina foi a seguinte:

- Fração *Water I* (FWI): 1 ml de H₂O
- Fração *Water II* (FWII): 1ml de H₂O
- Fração 1: 1ml de solução isopropanol a 25%
- Fração 2: 1ml de solução isopropanol a 50%
- Fração 3: 1ml de solução isopropanol a 75%
- Fração 4: 1ml de solução isopropanol a 100%
- Fração 5: 1ml de solução acetona/metanol a 50%
- Fração 6: 1ml de solução metanol a 100%

- Fração 7: 1ml de solução clorofórmio/metanol a 50%
- Fração 8: 1ml de solução clorofórmio a 100%
- Fração 9: 1ml de solução clorofórmio a 100%
- Fração 10: 1ml de solução éter etílico a 100%

As frações foram submetidas à temperatura ambiente para evaporar o solvente completamente, durante cerca de 5 a 10 dias, de forma a ficar apenas o extrato que se pretendia analisar. De seguida, as frações foram liofilizadas e dissolvidas em 500µl de DMSO, obtendo uma segunda biblioteca de extratos, extratos estes fracionados. Com base no artigo de Fernandez *et al.* (2008), estes extratos foram quantificados em miligrama de extrato (mge), indicando a quantidade de extrato seco das plantas da Guiné-Bissau usadas para preparar a solução de extrato (isto é, 200mg de extrato seco foi extraído e re-suspendido em 500µl de solvente para uma solução de concentração 0,4mge/µl). Por fim, estes extratos foram guardados a 4°C, de forma a serem utilizadas no procedimento do ponto 2.5.3..

2.3 Avaliação dos extratos vegetais quanto à sua composição em polifenóis

A quantificação de polifenóis foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927; Magalhães *et al.*, 2010) partindo de uma solução de FCR diluído 1:10 em 50% etanol com água Milli-Q, uma solução stock de propilgalato de sódio na concentração de 5mg/ml e tampão carbonato 6%. Este processo foi efetuado numa microplaca de 96 poços, começando por adicionar em primeiro lugar 50µl de solução propilgalato da Carl Roth®, depois 50µl de FCR da PanReac® e por fim 100µl de tampão carbonato a 6%, como mostra a Tabela 2. Para quantificar os polifenóis presentes nos extratos vegetais, foram colocados 50 µl de extrato vegetal numa concentração inicial de 1mg/ml, numa microplaca de 96 poços, contudo estes foram diluídos em diluição seriada de 1:2. Às diluições adicionou-se 50µl de FCR diluído 1:10 em água Milli-Q e adicionou-se de seguida 100µl de tampão de carbonato 6%. Após o procedimento, as microplacas foram incubadas à temperatura ambiente (25±1°C), e foram realizadas leituras a 760nm no espectrofotómetro Tecan Infinite M200 PRO

Multi-Detection Microplate Reader ao fim de 1 hora e 2 horas. Este ensaio foi feito em triplicado. Foi efetuado uma reta de calibração do propilgalato de sódio na concentração de 10 a 500µg/ml, em 50% etanol, de forma a determinar a concentração em polifenóis de cada amostra em estudo em mg/g equivalentes a propilgalato (mgEPG/g). No ensaio clínico foi incluído um branco de reação, em triplicado, que continha 50µl de etanol a 50% diluído em água Milli-Q.

Em algumas amostras com absorvâncias fora da reta de calibração foram feitos novos testes, com os extratos diluídos a 1:10 de forma a obter resultados dentro da reta de calibração.

Tabela 2 - Volume de reagentes para construção da reta de calibração de propilgalato.

Concentração final no poço (µg/ml)	Etanol a 50% (µl)	Solução de Propilgalato (µl)	FCR (1:10) (µl)	Carbonato a 6% (µl)	Volume Total (µl)
500	-	50	50	100	200
250	-	50	50	100	200
125	-	50	50	100	200
10	-	50	50	100	200
0 (Branco)	50	-	50	100	200

2.4 Avaliação dos extratos vegetais quanto à atividade de óxido nítrico

Este ensaio foi feito de acordo com o método descrito por Ho *et al.* (2010). Para tal, utilizou-se o 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, obtendo assim a reta de calibração.

Tanto para a solução padrão (ácido ascórbico) como para as amostras o procedimento foi executado em microplacas de 96 poços, foi adicionado 50µl de amostra (extrato

diluído em água Milli-Q) a 50µl de 10mM de SNP. A concentração inicial foi de 0,2mg/ml e foram feitas diluições de 1/2 até alcançar a concentração de 0,05mg/ml. O valor de 0mg/ml foi usado como controle. A mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 90 minutos. Ao fim deste tempo, adicionou-se igual volume (100µl) de reagente de Griess sendo de imediato lidas as placas através de um espectrofotômetro a 546nm. Foram adicionados poços como "brancos" que continham SNP e reagente de Griess e outros poços controle que continham ácido ascórbico e SNP. Todas as amostras foram processadas em triplicado.

Para avaliar a atividade de óxido nítrico dos extratos, aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ atividade inibitória} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde,

Abs_{controle} - Absorvância do SNP como controle a 546nm (controle negativo)

Abs_{amostra} - Absorvância do SNP com a amostra após 90min a 546nm

Após o ensaio, calculou-se o valor do IC_{50} , que é definido como a concentração de extrato em mgEPG/g de amostra que é necessária para inibir a 50% os radicais livres de NO. O valor foi obtido através de regressão linear de inibição versus concentração do extrato.

2.5 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em bactérias

2.5.1 Estirpes bacterianas usadas nos ensaios

Neste ensaio foram utilizadas cinco estirpes de referência, nomeadamente *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922, Culti-Loops, Thermo Scientific), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212, Culti-Loops, Thermo Scientific), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, Culti-Loops, Thermo Scientific) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Culti-Loops, Thermo Scientific). Estas estirpes encontravam-se congeladas a -70°C em meio Luria Bertani (meio L.B.) contendo 25% de glicerol (VWR).

2.5.2 Cultura das estirpes bacterianas

As bactérias testadas foram inoculadas em tubos com 6 ml de meio Muller-Hinton (meio M-H) e incubados a 37°C durante 24h, numa estufa de agitação para reativação das estirpes. Em simultâneo foram feitas placas com meio L.B. sólido para isolar *E. coli* e *E. faecalis*, meio *Pseudomonas* para isolar *P. aeruginosa*, meio Ágar-sal-Manitol (MSA) para *S. aureus* e *B. cereus*. Também estas placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

Após o crescimento das bactérias, estas foram repicadas e colocadas num tubo com 20ml de meio M-H e colocado na estufa durante 2h a 37°C de forma a obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland (McF) (McFarland, 1907).

2.5.3 Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana em meio sólido

A avaliação qualitativa da atividade antibacteriana foi realizada através do método de difusão em ágar por perfuração do ágar, observando a formação de halos de inibição ao redor das cavidades padronizadas (NCCLS, 2003; Antunes *et al.*, 2006).

Várias experiências-teste foram desenvolvidas de forma a obter homogeneidade da suspensão bacteriana. A concentração do inóculo foi realizada no espectrofotometro Jasco Model 7800 UV/VIS, sumarizada na Tabela 3:

Tabela 3 - Concentração do inóculo usado em cada bactéria teste

Estirpe bacteriana	McFarland	Absorvância a 625nm
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	1	0,257
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3	0,582
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4	0,669
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2	0,451
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	0,257

Deste modo, colocou-se em cada placa de petri esterilizada 15 ml de meio M-H sólido, deixando arrefecer. Após esse primeiro passo, colocou-se num tubo 3ml de meio M-H sólido liquefeito a 45°C/50°C e adicionou-se 100µl de suspensão bacteriana na placa (tabela 3). O meio é misturado em vórtex homogeneização da suspensão bacteriana e de seguida foi vertida para a placa de petri. Após solidificação foram realizados oito poços com a ponta da pipeta de *Pasteur* de plástico com diâmetro de 2mm. Em cada poço foi colocado 4µl de extrato numa concentração de 1mg/ml. Também neste ensaio foram usadas as diferentes frações na concentração de 0,4mg/µl. Como controlo negativo foi usado 2µl de ampicilina (concentração de 100mg/ml) e como controlo positivo 4µl de DMSO a 100%. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Os halos de inibição obtidos, em cada estirpe, para cada extrato vegetal, foram medidos em milímetros e as estirpes foram classificadas de acordo com Ostrosky *et al.* (2008) como: sensível (S), em que o diâmetro do halo de inibição é maior, igual ou não inferior a 3mm comparativamente ao controlo positivo; intermédia (I), halo maior que 2mm, mas inferior a 3mm em relação ao controlo positivo; ou resistente (R), diâmetro do halo é igual ou menor que 2mm.

2.5.4 Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana em meio líquido

A avaliação qualitativa da atividade antibacteriana foi realizada através do método de microdiluição em meio líquido. Este consiste em utilizar microplacas esterilizadas de 96 poços com fundo redondo. Em cada poço foi aplicado 90 µl de meio M-H e adicionado 10 µl de extrato vegetal (20mg/ml) nos primeiros poços das microplacas, como mostra a figura 16, tendo sido feita uma diluição de 1:2 nos poços subsequentes. De seguida todos os poços foram inoculados com 50µl de suspensão da bactéria correspondente, numa concentração de 10^6 unidades formadoras de colónias (UFC), ficando cada poço com um volume total de 100µl.

Assim, uma vez que a concentração inicial foi de 1mg/ml do extrato, nos poços seguintes teremos as seguintes concentrações: 0,5mg/ml; 0,25mg/ml; 0,125mg/ml; 0,0625mg/ml; 0,0312mg/ml; 0,0156mg/ml e 0,008mg/ml.

Ainda, foram incluídos dois controles negativos, em duplicado, contendo 50µl de suspensão bacteriana e 50 µl de antibiótico (ampicilina), e como controle positivo com 50 µl de suspensão bacteriana e 50 µl de meio M-H.

Este ensaio foi feito com as cinco estirpes bacterianas já referidas anteriormente no ponto 2.5.1.. O ensaio foi feito em triplicado para cada extrato vegetal extraído em metanol.

As microplacas de seguida foram incubadas a 37°C durante aproximadamente 20h. Ao fim deste tempo, foi realizada a leitura a 625nm no espectrofotometro das microplacas. De seguida foi aplicado em cada poço 5 µl de uma solução de 0,01µg/µl de resazurina diluída de 1:10 em H₂O estéril. As microplacas foram novamente incubadas a 37°C durante 3h, sendo lidas de hora-a-hora nas absorvâncias a 570nm e 625nm e determinado a CMI.

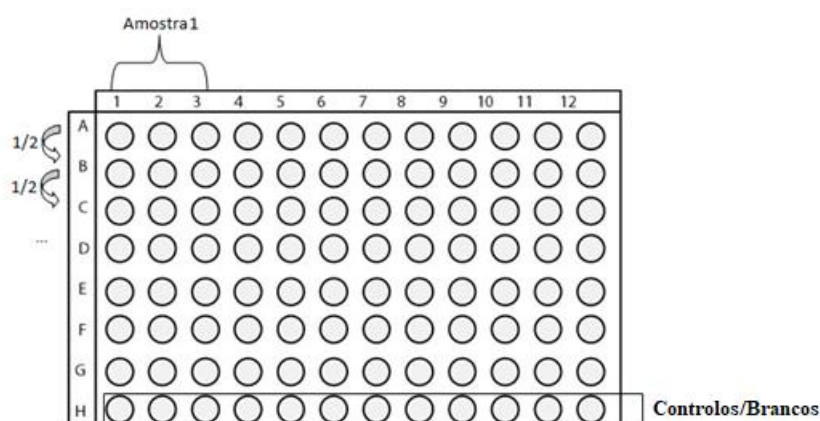


Figura 16 - Demonstração da aplicação das amostras na microplaca (imagem adaptada de Silva, 2014)

2.6 Avaliação da atividade dos extratos vegetais em células animais

2.6.1 Linhagem celular

As linhas celulares utilizadas neste ensaio foram: 3T3 não tumorais (oferta da AIDS Reagent, USA) e células Vero (oferta do Grupo de Virologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinárias).

2.6.2 Avaliação da viabilidade celular

O ensaio foi realizado de acordo com Jin *et al.* (2009) e Nemati *et al.* (2013) com modificações. Este teste foi realizado apenas com os extratos vegetais extraídos com o solvente metanol. Cada ensaio foi realizado em triplicado. Numa microplaca de 96 poços para cultura de células, foram colocadas 100µl de células numa concentração de 1×10^5 cél./ml por poço, em meio DME com 5% soro fetal. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h, em atmosfera controlada de 5% de CO₂. Após 24h, foi adicionado em cada poço 50µl de meio DME com 5% de soro fetal. Cada extrato foi diluído em meio DME com 5% de soro fetal. Adicionou-se 150µl do extrato diluído (1mg/ml) nos primeiros poços, procedendo de seguida a diluições seriadas de 1/2. Como controlo negativo, incluíram-se controlos com 5% de DMSO em meio de cultura e apenas com meio de cultura e células, sem extrato.

As placas foram a incubar a 37°C numa atmosfera controlada de 5% de CO₂, durante 72h. Ao fim deste tempo, foi removido todo o meio de cultura das placas e foi preparada uma solução *stock* de MTT na concentração de 0,5mg/ml em tampão fosfato-salino (PBS), adicionando 100µl desta solução em cada poço de forma a testar a proliferação celular.

A placa foi novamente incubada a 37°C a 5% CO₂ durante 3horas. Findo esse período a solução (PBS+MTT) foi removida e adicionado de seguida 100µl de uma solução de 100mM ácido clorídrico (HCl) em isopropanol absoluto para solubilizar os cristais formados durante a reação do MTT. Após homogeneização da solução em cada poço, as placas foram lidas num leitor de microplacas à densidade óptica (DO) de 570nm e a 650nm como referência. A densidade óptica celular para cada amostra foi calculada através da fórmula: $DO_{570nm} - DO_{650nm}$ (Lappalainen *et al.*, 1994; Khattak *et al.*, 2006), de forma a ter uma absorvância corrigida que poderá ser relacionada à concentração. De seguida, calculou-se a taxa de sobrevivência das células da seguinte forma:

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) / (Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{branco}})] \times 100$$

Onde,

Abs_{amostra} - Absorvância da amostra (extrato em teste)

Abs_{branco} - Absorvância do branco (meio DME)

Abs_{controle} - Absorvância do controle (linha celular em teste)

A fórmula anterior é útil de forma a percentagem de inibição dos extratos contra as linhas celulares em estudo, assim aplica-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células inibidas} = 100 - \% \text{ taxa de sobrevivência das células}$$

Assim, os efeitos dos extratos são determinados através do índice de citotoxicidade (IC₅₀), que significa a concentração do extrato que inibe a 50% do crescimento celular.

2.7 Avaliação dos extratos vegetais no *Toxoplasma gondii*

Neste teste foi utilizado *T. gondii*, estirpe RH (oferta da *AIDS Reagent, USA*).

O ensaio foi realizado de acordo com Jin *et al.* (2009) com modificações. O parasita *T. gondii* foi cultivado em células Vero em meio DME com 0,2% de soro fetal, purificado em tubos Percoll a 40%, após centrifugação a 1800 rpm durante 15 minutos. *T. gondii* foi recolhido através de uma seringa e agulha do tubo Percoll e colocado num novo tubo Percoll, em que foi lavado com PBS (pH=7.4) para ser novamente centrifugado a 1800 rpm durante 15 minutos. Depois de centrifugado, removeu-se o sobrenadante ficando o precipitado adicionando-se a este meio DME sem vermelho de fenol com 1% soro fetal. Após suspensão, foi determinado o número de taquizoítos num hemocitómetro e calculada a concentração celular, diluindo com meio DME sem vermelho de fenol com 1% soro fetal, para 1×10^5 células/ml.

Em paralelo, foram feitas cultura de células Vero para avaliar a citotoxicidade. Em microplacas de 96 poços, foram colocadas 100µl de células Vero e após 24 horas as células foram infetadas com 45µl de estirpe RH de *T. gondii*, na concentração indicada anteriormente, incubando a 37°C a 5% de CO₂ durante 24h. De seguida, as células foram expostas aos extratos vegetais (5µl) na concentração de 1mg/ml nos primeiros poços. Apenas a primeira linha de cada placa continha 200µl de células de forma a fazer diluições 1:2 do extrato vegetal nos poços subsequentes.

Foram utilizados dois tipos de controlo negativo, um com apenas meio de cultura e o outro com antibiótico, aplicando 5µl de antibiótico (Trimetoprim 15mg/ml /sulfometaxonol 2mg/ml) em 45µl de *T. gondii*. Os controlos positivos foram: um constituído apenas por 50µl de *T. gondii* e outro controlo constituído por 5µl de DMSO em 45µl de *T. gondii*.

De seguida, a placa foi a incubar a 37°C em atmosfera controlada 5% CO₂ durante 18h. Após este período a placa foi a centrifugar 200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 10µl de solução corante XTT/PMS (5mg/ml de sal tetrazólio (XTT) diluído em 5ml de PBS com 20µl de metossulfato de fenazina (PMS)). A placa voltou a ser incubada nas mesmas condições anteriores e ao fim de 2 horas foi feita a leitura no espectrofotómetro nas absorvâncias de 570nm e 650nm. Em cada extrato testado o ensaio foi feito em triplicado. A diferença de absorvâncias obtidas foi diretamente proporcional ao número de células viáveis em cada poço. Os valores das absorvâncias obtidas nos poços com extratos e nos poços sem extrato (apenas *T. gondii*) foram usados para determinar a percentagem (%) de viabilidade celular.

A taxa de sobrevivência de células é calculada da seguinte forma:

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) / (Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{branco}})] \times 100$$

2.8 Análise de dados

A análise de dados foi feita no programa Excel em que os dados correspondem à média de três repetições (n=3). Todos os ensaios foram realizados em triplicado, com exceção do ensaio qualitativo pelo método de difusão em ágar em que foi realizado apenas um único teste.

3 Resultados

3.1 Obtenção da biblioteca de extratos

Após a secagem completa dos extratos foi determinando o peso do extrato seco e calculado o rendimento total do mesmo obtendo assim os resultados demonstrados na Tabela 4:

Tabela 4 - Rendimento do extrato vegetal após extração com metanol

Nº amostra	P _{ext} (g)	C _i (mg/ml)	V _{DMSO} (µl)	R _{ext} (%)
1	0,0427	21,35	936,8µl C _i + 63,2 µl DMSO	21,3
7	0,2000	100	200 µl C _i +800 µl DMSO	100,0
8	0,0609	30,45	656,8 µl C _i + 343,2 µl DMSO	30,4
13	0,1044	52,2	383,1 µl C _i + 616,9 µl DMSO	50,0
10	0,0529	26,45	756,1 µl C _i + 243,9 µl DMSO	26,4
17Fo	0,1999	99,95	200,1 µl C _i + 799,9 µl DMSO	99,9
17Ra	0,0676	33,8	591,7 µl C _i +408,3 µl DMSO	33,8
22	0,1279	63,95	312,7 µl C _i + 687,3 µl DMSO	63,9
23	0,0402	20,1	995,0 µl C _i + 5 µl DMSO	20,1
24	0,1025	51,25	390,2 µl C _i +609,8 µl DMSO	51,2
27	0,0954	47,7	419,3 µl C _i + 580,7 µl DMSO	47,7
35	0,0448	22,4	892,9 µl C _i + 107,1 µl DMSO	22,4
5/19	0,0977	48,85	409,4 µl C _i + 590,6 µl DMSO	48,8
6/29	0,1998	99,9	200,2 µl C _i + 799,8 µl DMSO	99,9
15/37	0,0611	30,55	654,7 µl C _i + 345,3 µl DMSO	30,5
26/32	0,0686	34,3	583,1 µl C _i + 416,9 µl DMSO	34,3
33/28/34	0,0978	48,9	409 µl C _i + 591 µl DMSO	48,9
2292	0,1097	54,85	364,6 µl C _i + 635,4 µl DMSO	54,8
2303Rz	0,0234	-----	1170 µl DMSO	11,7

(continuação da tabela anterior)

Nº amostra	P _{ext} (g)	C _i (mg/ml)	V _{DMSO} (µl)	R _{ext} (%)
2303Fo	0,0231	-----	1155 µl DMSO	11,5
2349Ca	0,0115	-----	575 µl DMSO	5,7
2349Fo	0,0409	20,45	978 µl C _i + 22 µl DMSO	20,4
2356Rz	0,1114	55,7	359,1 µl C _i + 640,9 µl DMSO	55,7
2372Ca	0,0258	-----	1290 µl DMSO	12,9
2372Fo	0,1061	53,1	376,6 µl C _i + 623,4 µl DMSO	53,0
2372Rz	0,1004	50,2	398,4 µl C _i + 601,6 µl DMSO	50,2
2399Fo	0,0961	48,05	416,2 µl C _i + 583,8 µl DMSO	48,0
2400Fo	0,0874	43,7	457,7 µl C _i + 542,3 µl DMSO	43,7
2404Fo	0,1080	54	370,4 µl C _i + 629,6 µl DMSO	54,0

*P_{ext} - Peso do extrato em gramas (g); C_i - concentração inicial do extrato em mg/ml após adição de 2ml de DMSO; V_{DMSO} - Volume de DMSO em µl adicionado para obter uma concentração de 20mg/ml; R_{ext} - Rendimento do extrato em percentagem (%); n.d. - não detetável.

É de referir que alguns extratos tiveram um rendimento de 100% ou aproximadamente 100%, o que é indicativo de um teor quase nulo de água, havendo assim menor perda do princípio ativo.

De seguida adicionou-se aos extratos secos das plantas um volume de DMSO de acordo com o descrito no ponto 2.2. para a concentração de 20mg/ml (tabela 4), obtendo-se assim a biblioteca de extratos puros (Figura 17).

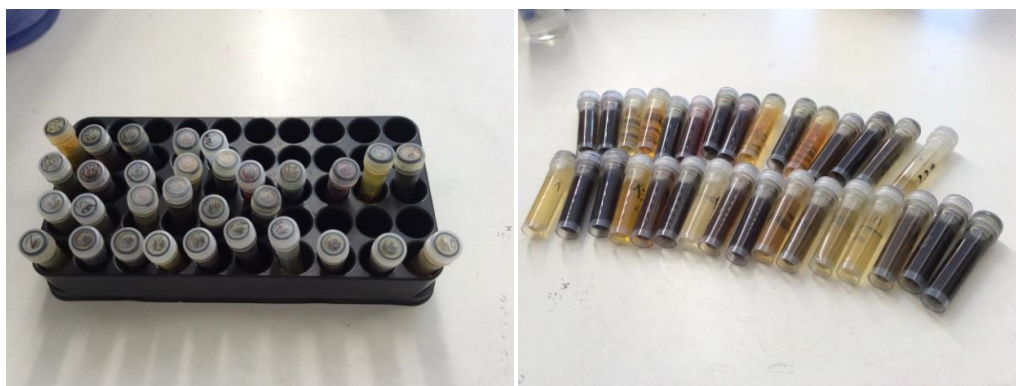


Figura 17 - Biblioteca de extratos obtidos da Guine Bissau descritos na tabela das plantas

No fracionamento das amostras extraídas em metanol, foi utilizada resina Diaion HP-20 (Figura 18). Após a lavagem com as 10 soluções para fracionamento dos extratos (Figura 19), estas também foram guardadas em tubos de congelação de propileno criando assim a biblioteca de extratos fracionados de concentração 0,4mge/μl (Figura 19).

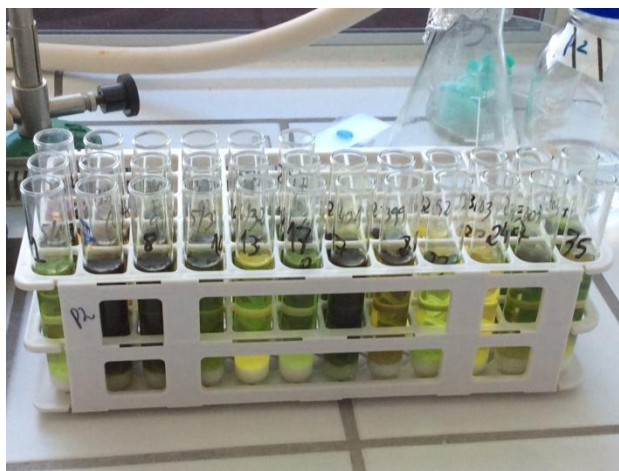


Figura 18 - Processo de extração com solventes orgânicos através da resina Diaion HP-20

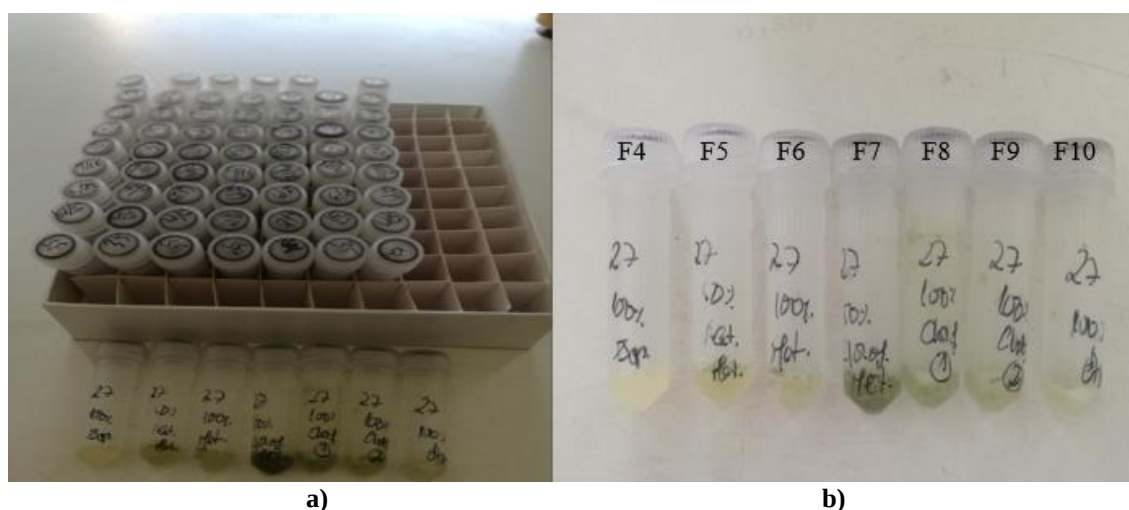


Figura 19 - a) Biblioteca de extratos fracionados. b) Alguns dos extratos fracionados: F4, F5, F6, F7, F8, F9 e F10.

3.2 Análise do ensaio qualitativo dos extratos vegetais em bactérias

Neste ensaio, foram testados todos os extratos realizados com metanol nas cinco bactérias (Gram positivas e Gram negativas). O resultado dos halos de inibição quando testados com alguns extratos puros, amostras 2303Rz e 2356Rz contra a bactéria *S. aureus* pode ser observado na Figura 20 (1), e os controles: positivo (Ampicilina) e negativo (DMSO) podem ser observados na Figura 20 (2).

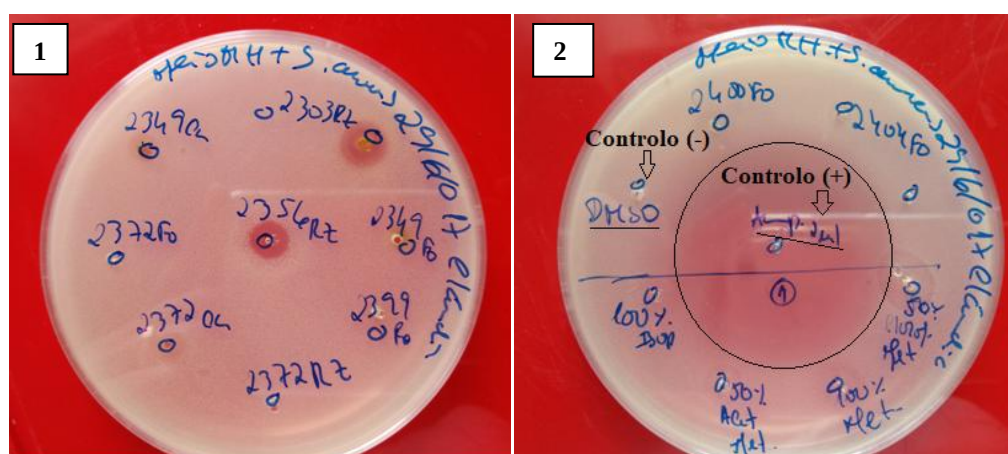


Figura 20 - Exemplo de halos de inibição da placa inoculada com *S. aureus*: 1) Halo de inibição dos extratos em metanol; 2) Halo de inibição do Controle positivo e negativo

Também foram testados os extratos fracionados partindo da concentração de 0,4mg/µl, isto é, a concentração final em cada poço foi de 1,6mg/µl, da Fração 4 à Fração 10, com os solventes acetona, clorofórmio, éter, isopropanol e metanol. Alguns exemplos do resultado do halo de inibição quando testados com alguns extratos fracionados, F5 até F9 da amostra 2303Rz contra a bactéria *B. cereus* (1), F4 da amostra 2303Fo contra a bactéria *P. aeruginosa* (2), F4 da amostra 17 Rz contra a bactéria *E. faecalis* (3) e F4 da amostra 2372Fo contra a bactéria *E. coli* (4) podem ser observados na Figura 21.

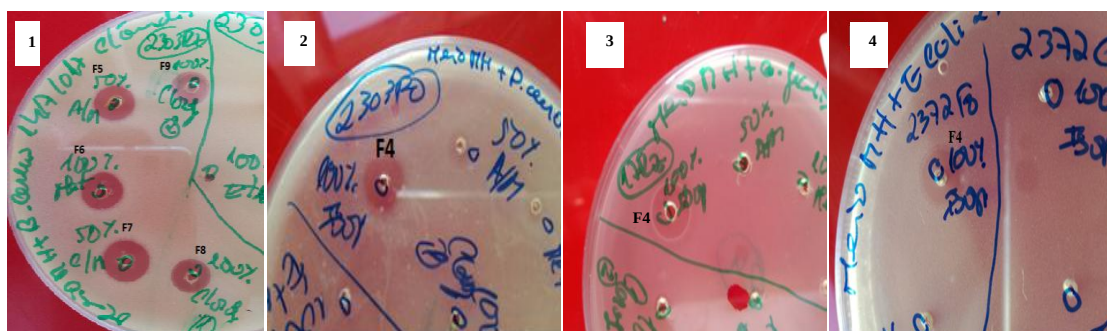


Figura 21 - Exemplo de halos de inibição da placa inoculada com *B. cereus* pelo extrato da raiz da planta *Zanthoxylum leprieuri* (1) e *P. aeruginosa* pelo extrato da folha da planta *Zanthoxylum leprieuri* (2), *E. faecalis* pelo extrato do ramo da planta *Abrus precatorius* (3) e *E. coli* pelo extrato da folha da planta *Sarcocephalus latifolius*(4).

Com base na observação e medição de inibição de halos bacterianos (Anexo 1, Tabela 8) a estirpe bacteriana pode ser definida como: sensível (S), intermédia (I) ou resistente (R), comparando o diâmetro de inibição com os diâmetros críticos estabelecidos pelo controlo positivo, segundo a classificação feita por Ostrosky (2008). Assim, com a aplicação desta classificação das estirpes bacterianas quando em contacto com extratos totais em metanol e extratos fracionados (Tabela 5), o extrato que provocou inibição nas cinco estirpes bacterianas foi nomeadamente o extrato F4 (100% isopropanol) das seguintes plantas: *Cassytha filiformis* (ramo) n°10, *Abrus precatorius* (ramo) n°17Ra, *Abrus precatorius* (raiz) n°2356Rz, *Allophylus africanus* (folha) n°26/32, *Zanthoxylum leprieuri* (folha) n°2303Rz, *Diospyros heudelotii* (folha) n°2349Fo, *Sarcocephalus latifolius* (folha) n°2372Fo, *Sorindeia juglandifolia* (folha) n°2399Fo e *Guiera senegalensis* (folha) n°2400Fo.

Tabela 5 - Classificação da estirpe bacteriana na presença de extratos em metanol e extratos fracionados

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	Estirpe bacteriana				
		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Ficus polita</i> (folha) nº1	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	R
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	R	R	R	R	R
<i>Psychotrya peduncularis</i> (folha) nº7	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	R
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	R	R	R	R	R
<i>Combretum micratum</i> (folha) nº8	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	I	R	R
	F5	R	R	I	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	I	R	R
	F8	R	R	I	R	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	R	R	I	R	I
<i>Strophanthus sarmentosus</i> (ramo) nº13	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	R
	F5	R	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	R	R	R	R	I

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	Estirpe bacteriana				
		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Cassipoupa filiformis</i> (ramo) nº10	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	S	I	I	I	I
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Abrus precatorius</i> (folha) nº17Fo	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	I	R	R
	F5	I	R	I	R	I
	F6	I	R	I	R	I
	F7	R	R	I	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	I
<i>Abrus precatorius</i> (ramo) nº17Ra	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	S	I	I	S	I
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	I	R	R
<i>Abrus precatorius</i> (raiz) nº2356Rz	Metanol	S	R	R	R	I
	F4	S	I	I	I	I
	F5	I	R	R	R	I
	F6	I	R	R	R	I
	F7	I	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Khaya senegalensis</i> (folha) nº22	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	I
	F5	R	R	R	R	I
	F6	I	R	R	R	I

		Estirpe bacteriana				
Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Khaya senegalensis</i> (folha) nº22	F7	I	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	I
	F10	R	R	R	R	R
<i>Faidherbia albida</i> (folha) nº23	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	R
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Cnestis ferruginea</i> (folha) nº24	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	R
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Hymenocardia acida</i> (folha) nº 27	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	I	R	I	R	I
	F5	S	R	I	R	I
	F6	I	R	I	R	I
	F7	I	R	I	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	I
	F10	R	R	R	R	R
<i>Calypotrochilum christyanum</i> (folha) nº35	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	R
	F5	R	R	I	R	I
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R

		Estirpe bacteriana				
Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Calypotrochilum christyanum</i> (raiz) nº2292	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	I	I	I	I
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Trichilia prieuriana subespécie prieuriana</i> (folha) nº5/19	Metanol	R	R	R	R	I
	F4	S	R	R	R	I
	F5	S	R	I	R	I
	F6	S	R	I	R	I
	F7	S	R	I	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	I
	F10	R	R	R	R	I
<i>Margaritaria discoidea</i> (folha) nº6/29	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	I
	F5	I	R	I	R	I
	F6	S	R	I	R	I
	F7	I	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	I
	F10	R	R	R	R	I
<i>Ocimum gratissimum</i> (folha) nº15/37	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	I
	F5	R	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	I
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	I
	F10	R	R	R	R	I
<i>Allophylus africanus</i> (folha) nº26/32	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	S	I	I	I	I
	F5	I	R	I	R	I
	F6	I	R	R	R	I

		Estirpe bacteriana				
Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Allophylus africans</i> (folha) nº26/32	F7	R	R	I	R	I
	F8	R	R	R	R	I
	F9	R	R	R	R	I
	F10	R	R	R	R	I
<i>Leptadenia hastata</i> (folha) nº33/28/34	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	I	R	I	I	I
	F5	R	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	I
<i>Zanthoxylum lepreuri</i> (folha) nº2303Rz	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	I	I	I	S	I
	F5	I	R	R	R	R
	F6	I	R	R	R	I
	F7	I	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	R	R	R	R	R
<i>Zanthoxylum lepreuri</i> (raiz) nº2303Fo	Metanol	S	R	R	R	I
	F4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F5	S	R	R	R	I
	F6	S	R	R	R	I
	F7	R	I	R	R	I
	F8	S	I	R	R	I
	F9	S	I	R	R	I
	F10	S	I	R	R	I
<i>Diospyros heudelotii</i> (casca) nº2349Ca	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	R
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	Estirpe bacteriana				
		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Diospyros heudelotii</i> (folha) nº2349Fo	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	S	I	I	I	I
	F5	R	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (casca) nº2372Ca	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	R	R	R	R	I
	F5	R	R	R	R	R
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (folha) nº2372Fo	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	S	I	I	S	I
	F5	R	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	I
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (raiz) 2372Rz	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	I	R	I	R	I
	F5	R	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	R
	F7	R	R	R	R	R
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Sorindeia juglandifolia</i> (folha) nº2399Fo	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	I	I	I	I	I
	F5	I	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	R

		Estirpe bacteriana				
Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Sorindeia juglandifolia</i> (folha) nº2399Fo	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Guiera senegalensis</i> (folha) nº2400Fo	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	S	I	I	I	I
	F5	S	R	R	R	I
	F6	I	R	R	R	I
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (folha) nº2404Fo	Metanol	R	R	R	R	R
	F4	I	R	I	I	I
	F5	I	R	R	R	I
	F6	R	R	R	R	I
	F7	R	R	R	R	I
	F8	R	R	R	R	R
	F9	R	R	R	R	R
	F10	R	R	R	R	R

N.T. - Não Testado; R - Resistente; I - Intermédia; S - Sensível

3.3 Análise da composição em polifenóis dos extratos vegetais

Neste ensaio, o objetivo era determinar a quantidade de composto fenólico equivalente a propilgalato presente nos extratos puros das amostras de plantas de acordo com a tabela 1.

O reagente Folin-Ciocalteu, quando na presença de compostos fenólicos reage, mudando a sua cor de amarelo para azul. Quanto mais intensa for a cor azul, maior é a quantidade de compostos fenólicos, ou seja, maior quantidade de substâncias redutoras existe, logo maior atividade antioxidante.

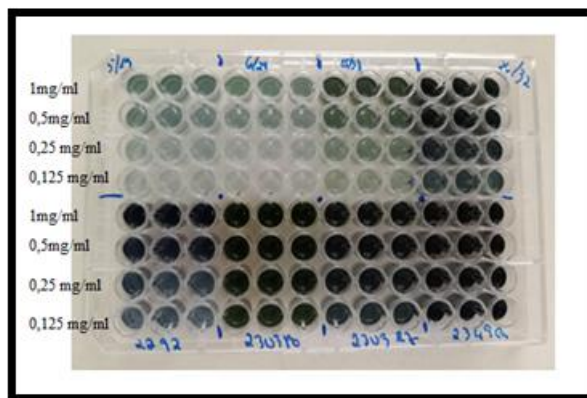


Figura 22 - Microplaca com a reação dos extratos ao reagente Folin-Ciocalteu.

No entanto, como surgiram algumas dúvidas em certas amostras com diluições de 1:2, que apresentavam uma cor praticamente homogênea, p.ex. 2303Fo, 2303Rz e a 2349Ca (Figura 22), procedeu-se a diluições de 1:10 da amostra de extrato vegetal (Anexo 2, Tabela 9) de forma a perceber se houve erro de leitura nas diluições feitas de 1:2.

Neste ensaio, o padrão usado como composto fenólico foi o propilgalato. A absorvância deste composto foi monitorizada durante duas horas, com leituras na primeira hora (1h) e na segunda hora (2h) como poderá ser observado no Anexo 2 (Figuras 31 e 32). No entanto, havendo um ligeiro aumento de valores de absorvância na segunda hora, considerou-se a segunda hora (2h) em termos de resultados (Figura 23). A equação da curva padrão do propilgalato (PG) que foi de $y = 0,0021x + 0,1023$ e o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9907$, onde x representa a concentração de polifenóis equivalente a propilgalato (mgEPG/g), y representa a absorvância a 760nm e R^2 representa o coeficiente de correlação. Assim, a partir do coeficiente de correlação poderemos dizer se o método é linear para a gama de concentração estudada, isto é, se o coeficiente for muito próximo do valor 1, o que é o caso ($R = 0,99$), então o método usado é linear.

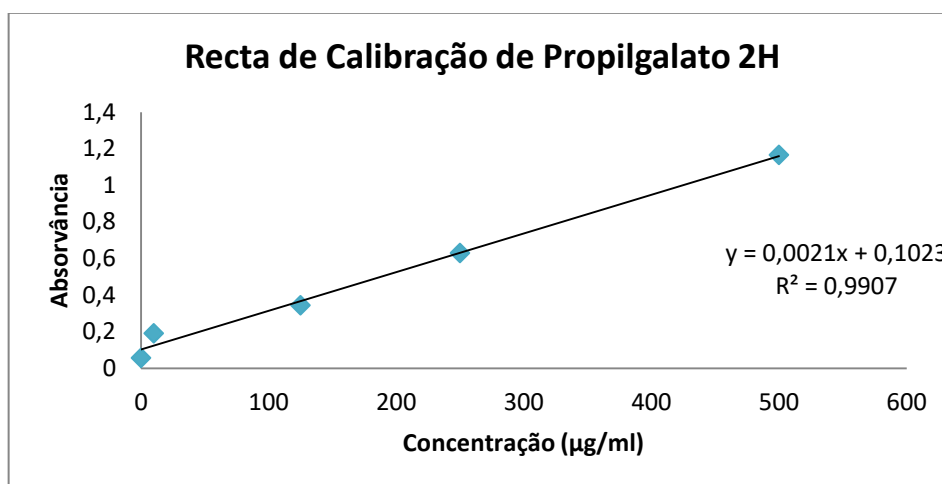


Figura 23 - Curva de calibração para determinar a concentração de polifenóis (mgEPG/g)

Com base na equação da Figura 23, calculou-se a concentração em mg/g equivalentes a propilgalato de sódio (EPG) e verificou-se através da Figura 24 que as amostras que apresentaram maior concentração em polifenóis totais foram a nº8: folha de *Combretum micratum* e a nº2349Ca: casca de *Diospyros heudelotii*, ultrapassando 25000mg/g EPG não excedendo o limite máximo de 200mg/Kg (FAO, 2019). No entanto, outras amostras de concentração acima de 1000mg/g EPG (Figura 24) foram: nº7 (folhas de *Psychotrya peduncularis*), nº10 (ramos de *Cassytha filiformis*), nº17Fo (folhas de *Abrus precatorius*), nº22 (folhas de *Kaya senegalensis*), nº23 (folhas de *Faidherbia albida*), nº24 (folhas de *Cnestis ferruginea*), nº27 (folhas de *Hymenocardia acida*), nº35 (folhas de *Calypstrochilum christyanum*), nº26/32 (folhas de *Allophylus africans*), nº2356Rz (raízes de *Abrus precatorius*), nº2292 (raízes de *Calypstrochilum christyanum*), nº2303Fo (folhas de *Zanthoxylum leprieuri*), nº2303Rz (raízes de *Zanthoxylum leprieuri*), nº2372Ca (cascas de *Sarcocephalus latifolius*), nº2399Fo (folhas de *Sorindeia juglandifolia*) e nº2400Fo (folhas de *Guiera senegalensis*). É de notar que as amostras 2303Fo e 2303Rz, que correspondem à planta *Zanthoxylum leprieuri*, apresentam elevada concentração em polifenóis tanto na parte das folhas como nas raízes, sendo contudo na raiz que existe a maior concentração de polifenóis.

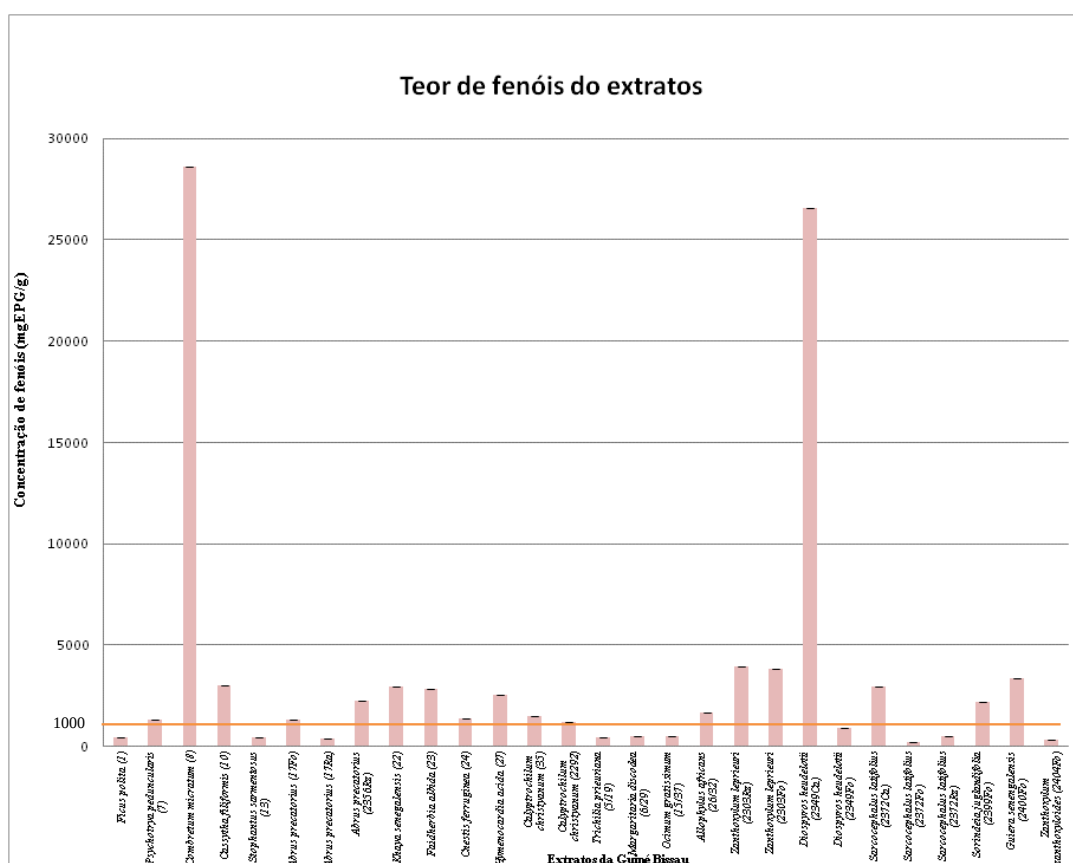


Figura 24 - Teor de fenóis em mgEPG/g dos extratos em metanol das plantas da Guiné-Bissau após 2h; $\pm$ SD

3.4 Análise da redução da atividade do óxido nítrico

A avaliação dos extratos puros como antioxidantes, extratos capazes de capturar e inibir o radical livre - NO, foi feito pelo método de Griess utilizando o ácido ascórbico como padrão. A equação da curva padrão de ácido ascórbico que foi de $y = -13,643x + 2,107$ e o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9639$ onde x representa a concentração de ácido ascórbico (mg/ml), y representa a absorvância a 546nm e R^2 representa o coeficiente de correlação (Figura 25). Assim, a partir do coeficiente de correlação poderemos dizer se o método é linear para a gama de concentração estudada, isto é, se o coeficiente for muito próximo do valor 1, o que é o caso ($R = 0,98$), então o método usado é linear.

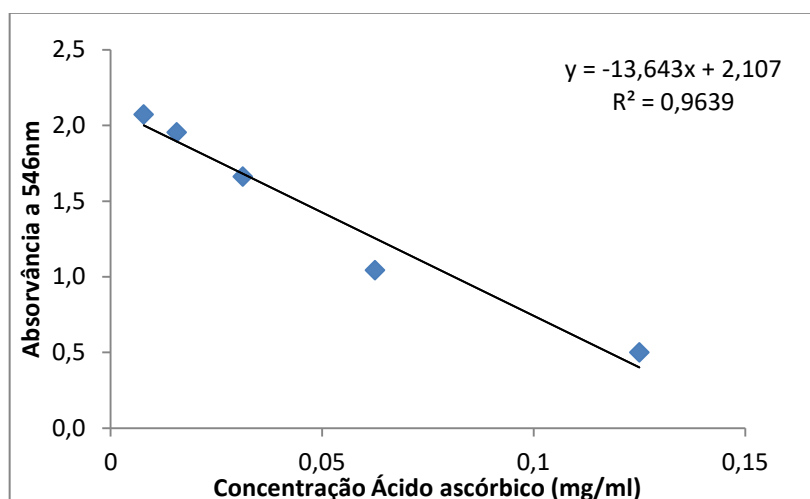


Figura 25- Curva de calibração para avaliar o NO

Este método foi utilizado para avaliar a atividade de óxido nítrico nas amostras de extratos puros, determinando a percentagem (%) da atividade de inibição do óxido nítrico (Anexo 3 Tabela 10) e ainda o IC₅₀ (Concentração Inibitória a 50%), resultados aferidos em Anexo 3 - Tabela 11 e na Figura 26.

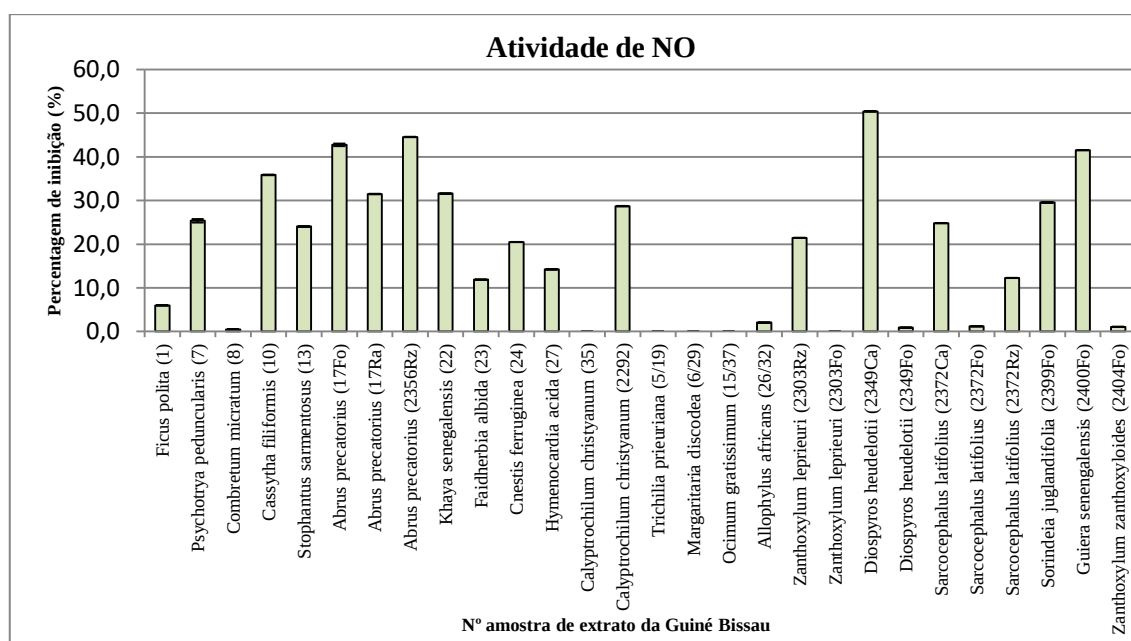


Figura 26 - Avaliação de extratos como antioxidantes, capturando o radical NO; $\pm$ SD

De acordo com o gráfico anterior, a amostra que possui maior capacidade de inibir o NO acima de 50% é a amostra 2349Ca que corresponde à planta *Diospyros heudelotii* sendo a casca a parte mais redutora de NO, com 0,2µg/ml de IC₅₀.

Ainda se verificou que as amostras 35 (extrato das folhas da planta *Calypstrochilum christyanum*), 5/19 (extrato das folhas da planta *Trichlia prieuriana* subespécie *prieuriana*), 6/29 (extrato das folhas da planta *Margaritaria discoidea*), 15/37 (extrato das folhas da planta *Ocimum gratissimum*), 2303Fo (extrato das folhas da planta *Zanthoxylum leprieuri*) são extratos ativadores.

3.5 Determinação da CMI para as cinco estirpes bacterianas

Neste ensaio, após a aplicação da resazurina os resultados foram visualizados macroscopicamente comparando os controlos com os extratos em teste, exemplo disso é a Figura 27.

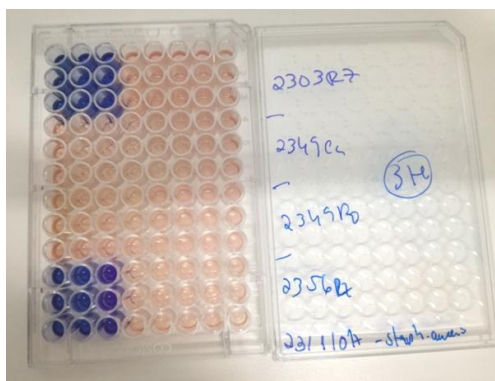


Figura 27 - Reação dos extratos à bactéria *S. aureus* após a aplicação da resazurina ao fim de 3 horas.

É de salientar que no controlo positivo (com antibiótico) não houve crescimento bacteriano, no controlo negativo houve crescimento bacteriano e nos poços com DMSO também houve crescimento bacteriano refletindo assim que o volume "em dobro" adicionado relativamente aos extratos não inibe as estirpes bacterianas usadas no ensaio. Assim, um dos extratos que ressalta logo à vista por provocar inibição bacteriana nas cinco estirpes usadas é o extrato 2303Rz (Tabela 6), que corresponde à planta *Zanthoxylum leprieuri*, sendo a parte da raiz a responsável por esta inibição.

Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória dos extratos metanólicos frente a microrganismos padrão

		CMI (após aplicação da resazurina durante 3horas) (mg/ml)				
Espécie	Nº amostra	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Ficus polita</i>	1	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Psychotrya peduncularis</i>	7	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Combretum micratum</i>	8	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Cassytha filiformis</i>	10	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Strophanthus sarmentosus</i>	13	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Abrus precatorius</i>	17Fo	-	-	>0,5	-	>0,5
	17Ra	-	-	>0,5	-	>0,5
	2356Rz	>0,25	-	>0,5	>0,125	>0,5
<i>Khaya senegalensis</i>	22	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Faidherbia albida</i>	23	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Cnestis ferruginea</i>	24	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Hymenocardia acida</i>	27	>0,5	-	>0,5	-	>0,5
<i>Calypetrochilum christyanum</i>	35	-	-	>0,5	-	>0,5
	2292	-	-	>0,25	-	>0,5
<i>Trichilia prieuriana</i> subespécie <i>prieuriana</i>	5/19	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Margaritaria discoidea</i>	6/29	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Ocimum gratissimum</i>	15/37	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Allophylus africans</i>	26/32	>0,5	-	>0,5	-	>0,5
<i>Leptadenia hastata</i>	33/28/34	N.T.	N.T.	>0,25	-	N.T.
<i>Zanthoxylum leprieuri</i>	2303Rz	>0,0625	>0,5	>0,5	>0,125	>0,5
	2303Fo	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5
<i>Diospyros heudelotii</i>	2349Ca	-	-	>0,5	-	>0,5
	2349Fo	-	-	>0,65	-	>0,5
<i>Sarcocephalus latifolius</i>	2372Ca	-	-	>0,5	-	>0,5
	2372Fo	-	-	>0,5	-	>0,5
	2372Rz	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Sorindeia juglandifolia</i>	2399Fo	-	-	>0,5	-	>0,5
<i>Guiera senegalensis</i>	2400Fo	>0,5	-	>0,125	>0,5	>0,5
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	2404Fo	>0,5	-	>0,25	-	>0,5

C+; C-; DMSO; N.T. - Não Testado; (-) - Não inibiu

3.6 Atividade dos extratos vegetais em células animais

Com base no procedimento efetuado, o teste MTT foi importante para determinar a percentagem de inibição do extrato contra as células e determinar o IC₅₀. Os resultados para a todos os extratos em teste, de concentração inicial de 1mg/ml, tem a particularidade de inibir as células VERO no mínimo a 86% (Anexo 4 Tabela 12). Assim, procedeu-se a sucessivas diluições (Anexo 4, Tabela 12) de forma a encontrar a concentração de extrato que inibe 50% o crescimento celular (IC₅₀), representada na figura 28.

Tabela 7 - Concentração em mg/ml de extrato capaz de inibir as células VERO e 3T3 (IC₅₀)

Espécie	Nº Amostra	IC ₅₀ VERO	IC ₅₀ 3T3
<i>Ficus polita</i>	1	0,69	1,2
<i>Psychotrya peduncularis</i>	7	0,75	0,59
<i>Combretum micratum</i>	8	0,81	0,71
<i>Cassytha filiformis</i>	10	0,67	0,98
<i>Strophanthus sarmentosus</i>	13	0,62	0,47
<i>Abrus precatorius</i>	17Fo	0,64	0,55
	17Ra	0,6	0,18
	2356Rz	0,56	0,47
<i>Khaya senegalensis</i>	22	0,68	7,8
<i>Faidherbia albida</i>	23	0,24	0,39
<i>Cnestis ferruginea</i>	24	0,62	0,53
<i>Hymenocardia acida</i>	27	0,71	0,63
<i>Calypstrochilum christyanum</i>	35	0,73	<0,125
	2292	0,72	0,56
<i>Trichilia prieuriana</i> subespécie <i>prieuriana</i>	5/19	0,66	<0,125

(Continuação da tabela anterior)

Espécie	Nº Amostra	IC ₅₀ VERO	IC ₅₀ 3T3
<i>Margaritaria discoidea</i>	6/29	0,57	<0,125
<i>Ocimum gratissimum</i>	15/37	0,66	<0,125
<i>Allophylus africanus</i>	26/32	0,74	0,45
<i>Zanthoxylum leprieuri</i>	2303Fo	0,43	0,49
	2303Rz	0,29	<0,125
<i>Diospyros heudelotii</i>	2349Ca	<0,125	0,8
	2349Fo	0,7	2,9
<i>Sarcocephalus latifolius</i>	2372Ca	0,66	1,8
	2372Fo	0,63	<0,125
	2372Rz	0,65	0,66
<i>Sorindeia juglandifolia</i>	2399Fo	0,66	2,4
<i>Guiera senegalensis</i>	2400Fo	0,7	0,56
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	2404Fo	0,68	5,3
	DMSO	0,61	1,2

Os extratos contra as células 3T3 face às células VERO demonstraram grande variabilidade no seu IC₅₀ (Anexo 4, Tabela 13), fazendo com que se optasse por usar apenas as células VERO na actividade com toxoplasma.

3.7 Ação dos extratos vegetais em *Toxoplasma gondii*

A partir da leitura das placas a 570 e 625nm, foi determinada a densidade ótica celular das células viáveis através da subtração da DO_{570nm} à DO_{625nm}, de forma a ter uma absorvância corrigida.

Com base nos valores de absorvância, procedeu-se ao cálculo da percentagem de células VERO viáveis perante os extratos. Os controlos usados foram dois: controlo positivo - poços com células VERO mas sem extrato que correspondiam a 100%, e controlo negativo - poços com células mas com adição de Antibiótico nas mesmas concentrações que os extratos. Os resultados obtidos para as amostras extraídas com metanol estão apresentados na figura 28.

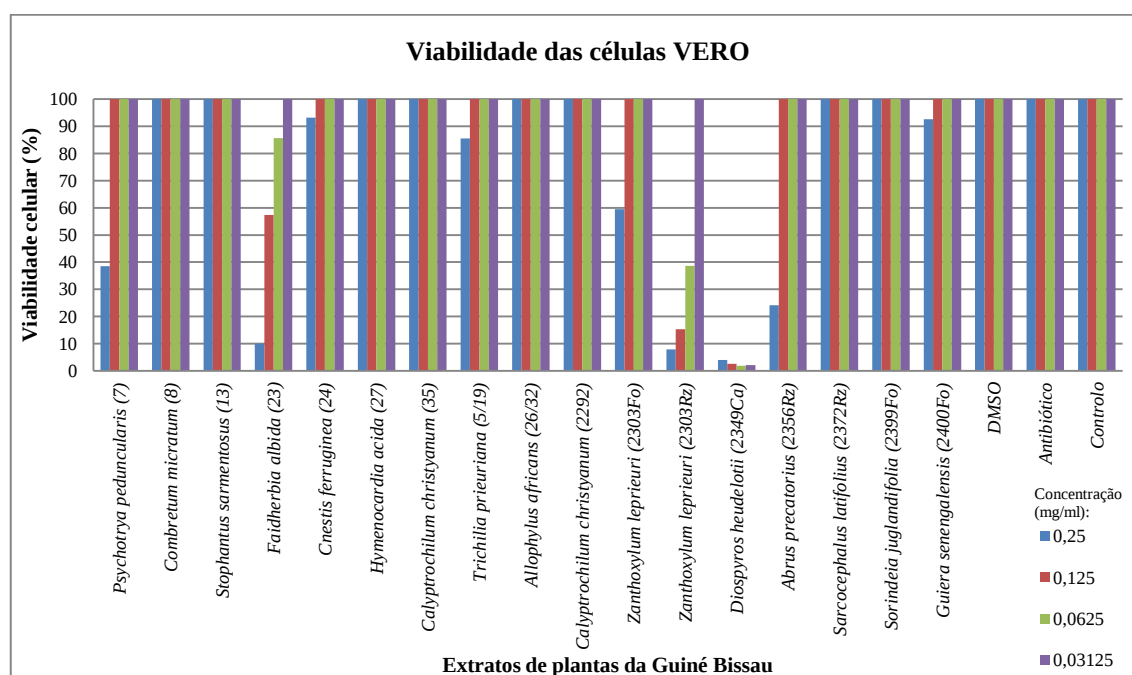


Figura 28 - Percentagem de células VERO viáveis após exposição às amostras extraídas em metanol

Assim, o nosso controlo positivo correspondeu ao esperado, ou seja, as células VERO estavam viáveis a 100%. Verificou-se ainda que o Antibiótico não inibiu as células VERO no entanto inibiu as células parasitadas por *T. gondii* nas concentrações 0,0625 e 0,03125mg/ml. Também se verificou que o DMSO não inibe as células VERO nem o parasita *T. gondii* (Figura 29).

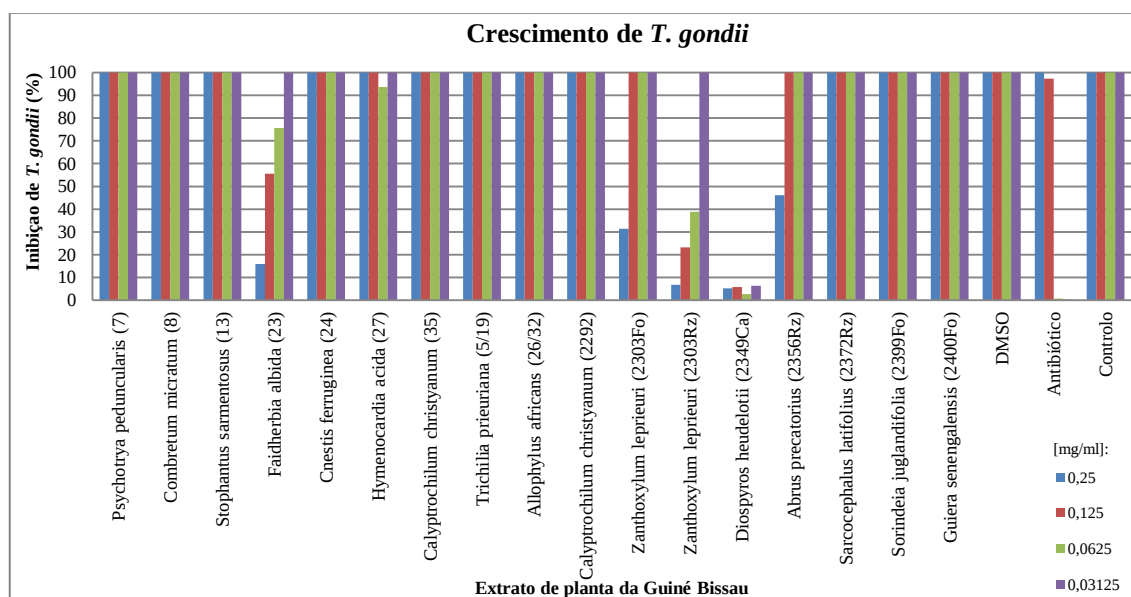


Figura 29 – Percentagem de inibição de *T. gondii* após exposição às amostras extraídas em metanol.

No entanto, quando as células VERO foram expostas aos extratos, alguns demonstraram inibição celular, nomeadamente as amostras 7, 23, 2303Fo, 2303Rz, 2349Ca e 2356Rz. Destas amostras, a única que não teve o mesmo comportamento quando exposta ao parasita *T. gondii* foi a amostra 7, apresentando um crescimento nos poços de 100% de *T. gondii*. Todas as amostras, à exceção das referidas anteriormente demonstraram atividade inibidora contra *T. gondii* (Figura 29).

4 Discussão

4.1 Determinação da suscetibilidade bacteriana aos extratos em meio sólido e líquido

Para as cinco 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 M-H pela difusão em agar com perfuração do meio sólido, e os ensaios em meio líquido correspondem à determinação da CMI em meio M-H líquido.

4.1.1 Em meio sólido

A partir deste método, usando 22 plantas da Guiné-Bissau originando 29 amostras, um dos resultados que ressalta é o facto dos extratos, tanto puros como fraccionados, a partir das folhas das plantas *Ficus polita*, *Psychotrya peduncularis*, *Faidherbia albida* e *Cnestis ferruginea* e da casca da planta *Diospyros heudelotii*, não demonstrarem qualquer tipo de inibição nas bactérias usadas.

A atividade dos extratos foi comparada com um controlo negativo, o solvente DMSO utilizado para diluição dos extratos, e um controlo positivo, o antibiótico Ampicilina utilizado nas cinco estirpes bacterianas (Santos, 2014). Assim, verificou-se que nas cinco estirpes bacterianas o DMSO (controlo negativo) apresentava crescimento bacteriano e o antibiótico Ampicilina produzia um halo de inibição no crescimento bacteriano das cinco estirpes, demonstrando a sensibilidade do método de ensaio.

De acordo com a classificação de Ostrosky *et al.* (2008), foi possível constatar que as seguintes bactérias apresentaram diferente sensibilidades às frações testadas:

- a) Bactéria *B. cereus*: apresentou-se sensível à fração F4 dos ramos da espécie *Abrus precatorius* e da espécie *Cassytha filiformis*, e às frações F5 e F6 da raiz *Zanthoxylum lepriuri*.
- b) Bactéria *P. aeruginosa* apresentou-se sensível à fração F4 da folha *Sarcocephalus latifolius*, da folha *Zanthoxylum lepriuri* e do ramo *Abrus precatorius*.

c) Estirpes bacterianas *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli* apresentaram apenas moderada sensibilidade, classificando-as de moderadamente sensíveis, para as frações F4 do ramo *Cassytha filiformis* e *Abrus precatorius*, da raiz *Abrus precatorius*, e das folhas de *Diospyros heudelotii*.

d) Estirpe bacteriana *S. aureus* apresentou apenas moderada sensibilidade, classificando-a de moderadamente sensível, para a fração F4 da planta *Sarcocephalus latifolius*.

e) Estirpe bacteriana *E. faecalis*, apresentou susceptibilidade moderada para a fração F4 dos ramos *Abrus precatorius*.

f) Estirpe bacteriana *E. coli* apresentou sensibilidade moderada à fração F4 da folha de *Diospyros heudelotii*, dos ramos de *Abrus precatorius* e *Cassytha filiformis* e da raiz de *Abrus precatorius*.

Dos resultados acima descritos, pode-se concluir que a fração F4 eluída com 100% isopropanol, de um modo geral, apresenta uma maior capacidade de inibição do crescimento bacteriano, sendo este facto comum a grande parte dos extratos testados.

Além do isopropanol existem outros solventes também bons na remoção de lípidos, como a conjugação de clorofórmio com metanol. No entanto, não se mostraram tão eficazes na inibição das bactérias. Eventualmente, porque o isopropanol fez logo a remoção do composto biológico ativo.

Assim, seria interessante proceder ao fracionamento dos compostos destas plantas através da técnica por HPLC de forma a identificar qual o composto biológico ativo na fração F4 (isopreno) das plantas que apresentam atividade antibacteriana para as estirpes em estudo.

Embora na planta *Zanthoxylum lepreuri* (raiz), a fração F4 não tenha sido feita, o que teria sido interessante para ver se apresentaria atividade antibacteriana eventualmente a partir de um composto lipídico, no entanto foi a única planta que mostrou inibição nas bactérias Gram negativas, *E. coli* e *P. aeruginosa*, nos fracionamentos F7 até ao F10. Sabendo que tanto o F7, F8 e F9 foram extraídos com clorofórmio a 100% ou tendo 50% desse solvente, e que o clorofórmio é muito usado para extração de alcalóides mas também de lípidos, e o F10 extraídos com 100% éter que é usado para extração de

lípidos, pode-se inferir que o que torna as bactérias suscetíveis ao extrato é talvez um composto biológico ativo comum aos dois solventes. Assim, coloca-se a hipótese se o composto biológico comum ser de origem lipídica, uma vez que os lípidos de um modo geral são solúveis em solventes apolares como o éter e o clorofórmio (Levitov *et al.*, 2013) e que a ação conjunta de clorofórmio com o metanol origina um bom solvente para extrair compostos lipídicos (Silva, 2014).

As plantas que demonstraram melhor ação antibacteriana foram: *Cassytha filiformis* (ramo), *Diospyros heudelotii* (folha), *Abrus precatorius* (ramo e raiz), *Sorindeia juglandifolia* (folha), *Guiera senegalensis* (folha), *Allophylus africanus* (folha), *Zanthoxylum leprieuri* (folha) e *Sarcocephalus latifolius* (folha). Todas estas plantas apresentaram ação antibacteriana a partir dos extratos fracionados F4 tendo a capacidade de inibir todas as bactérias usadas neste estudo, independentemente de serem Gram positivas ou Gram negativas, constatando que a constituição da parede celular bacteriana, ou seja, os peptidoglicanos não são fator importante para a inibição destas estirpes bacterianas. O mesmo se verifica na concentração de inóculo, pois usaram-se diferentes concentrações de inóculo bacteriano, à exceção das bactérias *B. cereus* e *S. aureus* com igual concentração (1McF). Habitualmente a concentração de inóculo é de 0,5McF, neste estudo as concentrações conforme descrito no ponto 2.5.3. (Tabela 3) foram bastante superiores, não deixando assim de ter halos de inibição por parte dos extratos em estudo.

Segundo Mamman e Isa (2013), o extrato metanólico das folhas de *Guiera senegalensis* inibem as bactérias *S. aureus* e *E. coli* podendo ser utilizadas para tratamento de infecções provocadas por estas bactérias.

Combinando a técnica de fracionamento, que tem a capacidade de concentrar os principais compostos ativos através da separação de compostos orgânicos dos sais inorgânicos, com o solvente metanol, o qual tem a capacidade de extrair compostos glicosídeos, observou-se por comparação entre o extrato puro em metanol e o extrato fracionado F6 (100% metanol), que o extrato fracionado F6 produzia um aumento da inibição nas bactérias Gram positivas, com halos significativamente maiores, relativamente às plantas *Trichilia prieuriana* subespécie *prieuriana* (folha), *Abrus precatorius* (folha), *Margarita discordeia* (folha) e *Hymenocardia acida* (folha). Assim, mostrando que o fracionamento é mais favorável à inibição bacteriana.

4.1.2 Em meio líquido

As bactérias *E. faecalis* e *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade a todas as plantas em estudo extraídas por metanol, numa concentração de 0,5mg/ml.

A planta *Zanthoxylum leprieuri* mostrou ser bactericida para as cinco estirpes usadas, salientando que a parte da raiz (2303Rz) da planta é mais ativa que a parte das folhas (2303Fo). As concentrações mínimas inibitórias na amostra 2303Rz oscilam, sendo nalgumas estirpes mais baixas que noutras, enquanto que na amostra 2303Fo o CMI é >0,5 mg/ml em todas as estirpes bacterianas usadas.

Outras duas plantas que demonstraram ser mais ativas, com exceção para a bactéria *E. coli*, foram a parte da raiz da planta *Abrus precatorius* (2356Rz) e as folhas da planta *Guiera senegalensis* (2400Fo). Para comparar o ensaio realizado em meio líquido com o realizado em meio sólido, seria necessário desenvolver novos testes, mantendo em ambos as mesmas concentrações o que não foi possível no presente trabalho.

4.2 Composição dos extratos vegetais testados em polifenóis e óxido nítrico

A quantificação dos fenólicos totais nos extratos de plantas da Guiné-Bissau através do método de Folin-Ciocalteu revelou uma gama de aproximadamente 353,1 a 28590mg/g equivalente ao propilgalato na concentração inicial de 1mg/ml de extrato puro.

Os extratos com maior concentração de polifenóis, acima de 2000mgEPG/g, foram: *Cassytha filiformis* (10), *Abrus precatorius* (2356Rz), *Khaya senegalensis* (22), *Faidherbia albida* (23), *Hymenocardia acida* (27), *Zanthoxylum leprieuri* (2303Fo, 2303Rz), *Sarcocephalus latifolius* (2372Ca), *Sorindeia juglandifolia* (2399Fo), *Guiera senegalensis* (2400Fo), sobressaindo acima de 25000mgEPG/g os extratos por ordem crescente *Combretum micratum* (8) e *Diospyros heudelotii* (2349Ca).

Segundo Touré e colaboradores (2011), os polifenóis das folhas da planta *Combretum micratum* dominantes são ácido gálico, tri-hidrato de rutina, catequina e ácido benzoico. Também noutros estudos constatou-se que o extrato metanólico das folhas de

Combretum micratum apresentavam atividade antiviral *in vitro* (Ferrea *et al.*, 1993) e também anti-inflamatória (Olajide *et al.*, 2003).

De diferentes espécies do género *Diospyros* da família Ebenaceae foram isolados fitoquímicos nomeadamente polifenóis, terpenóides, taninos, hidrocarbonetos e lipídeos, entre outros (Rauf *et al.*, 2017). Este género *Diospyros*, através de vários testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos, demonstrou atividade biológica, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, anti-helmíntica, inibidora de enzimas, entre outras. No entanto, quanto à espécie por nós estudada *Diospyros heudelotii*, ainda não existem estudos descritos sobre os seus constituintes fitoquímicos e a(s) sua(s) actividade(s) biológica(s). Assim, foi verificado por nós que esta espécie *Diospyros heudelotii* era também rica em compostos polifenólicos. Após isto, seria interessante, no futuro poder isolar-se e estudar-se os seus componentes mais ao pormenor de modo a demonstrar a sua eficácia e quem sabe testar os seus poderes na prevenção do cancro, doenças inflamatórias e cardiovasculares. Atualmente, os investigadores são aconselhados a pesquisar plantas ricas em polifenóis pois através de diferentes estudos tem se verificado eficácia anticancerígena em produtos de origem vegetal contendo elevados níveis de polifenóis ou outros antioxidantes, de forma a descobrir novos fármacos anticancerígenos (Oyenihi & Smith, 2019).

De todas as amostras testadas, foi a amostra 2349Ca referente à planta *Diospyros heudelotii* extraída em metanol que demonstrou ser capaz de inibir a formação de nitrito com maior eficácia a 50%, a partir de uma solução de nitroprussiato de sódio. Diversos estudos, já demonstraram que o excesso de NO pode estar na origem e no desenvolvimento de diversas patologias (Yang *et al.*, 2010; Tataranno *et al.*, 2015), nomeadamente de encefalite grave provocada pelo *T. gondii*. De acordo com vários estudos, o excesso de NO exógeno estimula a saída precoce do parasita *T. gondii* dos macrófagos peritoneais infetados, sendo importante limitar a carga parasitária e a formação de quistos (Roitt *et al.*, 2003; Dincel & Atmaca, 2015; Yan *et al.*, 2015). Desta forma, extratos que sejam capazes de capturar o NO podem ser úteis como alternativa na prevenção, atraso ou terapia de doenças por stress oxidativo. Estes extratos podem ser utilizados como novos antioxidantes naturais ou então no desenvolvimento de novos fármacos.

4.3 Ensaio de citotoxicidade em células animais

As células animais não tumorais (células VERO e 3T3) foram testadas de modo a verificar a sua viabilidade após exposição aos extratos das plantas extraídas em metanol. Em geral, verificou-se que os extratos inibem as células não tumorais mostrando serem tóxicos para as mesmas. No entanto, aquele que apresenta um IC₅₀ mais baixo em simultâneo e em ambas as células (VERO e 3T3) é a amostra 2303Rz pertencente à espécie de planta *Zanthoxylum leprieuri*. Contudo talvez fosse necessário investigar também a reação a células tumorais tais como, HeLa (células tumorais da cervical uterina), HepG2 (células tumorais do fígado humano) e ainda BeWo (células trofoblásticas do coriocarcionoma humano) (Franco *et al.*, 2011), expostas a estes extratos de modo a determinar o LC₅₀ e determinar o index relativamente às células não tumorais (Zirihi *et al.*, 2005; Silva, 2014).

De acordo com Misra *et al.* (2013), foram identificados compostos como citrionelol e geraniol no óleo essencial *Zanthoxylum zanthoxyloides* e E-β-ocimeno, 7,8-dimetoxicumarina e ácido sinápico no extrato metanólico de *Zanthoxylum leprieuri* isolados a partir da fruta de ambas as plantas que exibem atividades antimicrobianas e antineoplásicas moderadas.

4.4 Atividade anti -*Toxoplasma gondii*

Atualmente, existe uma grande necessidade de encontrar novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, nomeadamente a toxoplasmose, uma vez que os fármacos utilizados apresentam algumas limitações como baixa eficácia e alta toxicidade (Mancini *et al.*, 2012; Kavitha *et al.*, 2012). Por outro lado, os fármacos existentes apenas atuam contra a forma de taquizoítos do toxoplasma, sendo as infeções por *T. gondii* normalmente assintomáticas quer na fase aguda, quer na fase crónica que permanece para o resto da vida do hospedeiro infetado (Silva, 2014; Blume & Seeber, 2018).

Neste estudo, interessava verificar se alguma das plantas da Guiné-Bissau apresentava atividade anti-*T. gondii*. Deste modo, procedeu-se à extração das plantas por metanol e

verificou-se que os extratos das espécies *Zanthoxylum lepriouri* (folha, amostra 2303Fo) e *Abrus precatorius* (raiz, amostra 2356Rz) não inibiam *T. gondii* na concentração 0,25mg/ml. As espécies *Faidherbia albida* (folha, amostra 23) e *Zanthoxylum lepriouri* (raiz, amostra 2303Rz) não inibiam *T. gondii* da concentração mais alta 0,25 até à 0,0625mg/ml.

Na bibliografia mais recente têm surgido uma série de estudos que recaem sobre o género *Zanthoxylum*. De acordo, com Goodman *et al.* (2016), o género *Zanthoxylum* tem sido alvo de investigação para identificar novos compostos com atividade anti-parasitária e para validar o uso medicinal, nomeadamente no extrato da casca da espécie *Zanthoxylum heitzii* identificaram três compostos com atividade antiparasitária. Já Adia *et al.* (2016), relata outra espécie *Zanthoxylum chalybeum* como tendo um composto que contribui para a atividade contra *Plasmodium falciparum*. Os investigadores Yadav e Tangpu (2009), relatam que as folhas de *Zanthoxylum rhetsa* possuem propriedades anti-Cestodes (helminthas). Mas foi Misra *et al.* (2013), que identificaram alguns compostos nos extratos das frutas das espécies *Zanthoxylum zanthoxyloides* e *Zanthoxylum lepriurii* com atividades antimicrobianas e antineoplásicas moderadas.

Quanto à espécie *Abrus precatorius*, Limmatvapirat *et al.* (2004), afirma que esta espécie exibe atividades antituberculares, antiplasmodiais e citotóxicas, atividades antivirais e citotóxicas moderadas.

De acordo com os investigadores, Hata e seus colegas (2014), a espécie *Abrus precatorius ssp. africanus* tem elevada atividade antitripanossomal contra *Tripanossoma brucei rhodesiense* (100%) e ainda atividade antiplasmódica contra *Plasmodium falciparum* (98%), e com menor percentagem mas ainda com capacidade de inibição para *Leishmania donovani* (76%), ou seja, elevada atividade antiparasitária.

Quanto à espécie *Faidherbia albida* (amostra 23), os estudos que existem são maioritariamente etnobotânicos e não foram encontrados estudos relacionados com atividade antimicrobiana e antineoplásica. No entanto, já existem alguns estudos que sugerem que esta espécie possui atividade antiparasitária. Salawu e seus colegas (2010), sugerem que o extrato etanólico da casca do caule de *Faidherbia albida* possui efeitos antimaláricos. Também Tijani *et al.* (2009), sugerem que o extrato hidroalcoólico de *Faidherbia albida* tem atividade tripanostática contra *Trypanossoma brucei brucei*. Contudo, também Silva (2014), verificou que o extrato metanólico desta planta inibia o crescimento celular das células VERO parasitadas por *T. gondii*.

Porém, a espécie que teve menor capacidade de inibir o parasita *T. gondii* nas quatro concentrações testadas (0,25 até à 0,03125mg/ml) foi a espécie *Diospyros heudelotii* (casca, amostra 2349Ca). Para esta espécie *Diospyros heudelotii* não se encontra ainda nada relatado sobre a sua atividade antiparasitária. Segundo, Ganapaty *et al.* (2006), alguns compostos da raízes de *Diospyros assimilis* foram isolados e apresentaram atividade antiprotozoária contra os géneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Olasehinde *et al.* (2014), também referiram que o extrato etanólico da folha *Diospyros monbuttensis* inibia o parasita *Plasmodium falciparum* com bom potencial antimalárico. Saini *et al.* (2015), relatam que o extrato da casca do caule de *Diospyros perigrena* induz apoptose em diferentes estádios do ciclo de vida de *Setaria cervi*, induzindo a atividade antifilarial.

5 Conclusão

Este trabalho constituiu um ponto de partida para dar a conhecer possíveis plantas promissoras para o desenvolvimento de fármacos, sejam eles antibacterianos, antiparasitários ou quimiopreventivos.

Das 22 plantas testadas, as espécies que demonstraram melhor ação antibacteriana foram: *Cassytha filiformis* (ramo), *Diospyros heudelotii* (folha), *Abrus precatorius* (ramo e raiz), *Sorindeia juglandifolia* (folha), *Guiera senegalensis* (folha), *Allophylus africans* (folha), *Zanthoxylum leprieuri* (folha) e *Sarcocephalus latifolius* (folha). Depois do extrato ser fracionado, observou-se um aumento da atividade antibacteriana para as frações F4 e F6. Com base na utilização das soluções usadas neste estudo, comprovou-se que alguns dos compostos biologicamente ativos são os alcalóides. Assim, arriscariamos afirmar que estas plantas têm compostos antibacterianos dignos de pesquisa para eventuais fármacos antibacterianos.

Os extratos das plantas testadas neste trabalho apresentaram atividade muito tóxica para as células: Células VERO e 3T3, nas concentrações testadas.

Os extratos metanólicos das plantas *Faidherbia albida* (folha), *Abrus precatorius* (raiz), *Diospyros heudelotii* (casca), *Zanthoxylum leprieuri* (raiz e folha) não demonstraram atividade anti-*T. gondii*.

Os extratos das plantas *Cassytha filiformis* (ramo), *Abrus precatorius* (raiz), *Khaya senegalensis* (folha), *Faidherbia albida* (folha), *Hymenocardia acida* (folha), *Zanthoxylum leprieuri* (folha e raiz), *Sarcocephalus latifolius* (casca), *Guiera senegalensis* (folha), *Combretum micratum* (folha) e *Diospyros heudelotii* (casca), demonstraram maior atividade antioxidante tornando-se assim promissores para a pesquisa de quimiopreventivos.

Em virtude do exposto, os extratos das espécies de plantas: *Abrus precatorius*, *Diospyros heudelotii* e *Zanthoxylum leprieuri* foram aqueles que apresentaram melhores resultados para os objetivos pretendidos, isto é, extratos com atividade antibacteriana, e

quimiopreventiva, apresentando-se como fortes potenciais candidatos ao desenvolvimento de fármacos.

Futuramente, seria interessante investigar mais minuciosamente estas três espécies no seu todo, aplicando novamente as mesmas técnicas para confirmação do que foi apresentado neste trabalho. Novas concentrações de extrato destas plantas e outras técnicas novas e diferentes devem ser testadas, a fim de aprofundar o seu conhecimento, nomeadamente, a sua ação, utilizando técnicas cromatográficas, como a HPLC, que permite a identificação e a quantificação de compostos ativos.

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.
- Adia, M. M., Emami, S. N., Byamukama, R., Faye, I. & Borg-Karlson, A. K. 2016. Antiplasmodial activity and phytochemical analysis of extracts from selected Ugandan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 186:14-19.
- Almeida, M. Z. 2011. *Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea*. Plantas Medicinais, Salvador, EDUFBA.
- Alvarenga e Melo, R. C. 2005. Plantas Medicinais, óleos essenciais e Aromas. *Revista Eletrônica Nutritime*, 2(2):193 - 200.
- Amendoeira, M. R. R. & Camillo-Coura, L. F. 2010. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Scientia Medica*, 20(1):113-119.
- Andreo, D. & Jorge, N. 2006. Antioxidantes naturais: Técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(2):319-336.
- Antunes, R. M. P., Lima E. O., Pereira, M. S. V., Camara, C. A., Arruda, T. A., Catão, R. M. R., Barbosa, T. P., Nunes, X. P., Dias, C. S. & Silva, T. M. S. 2006. Atividade antimicrobiana " in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 517-524.
- Atindehou, K. K., Schmid, C., Brun, R., Koné, M. W. & Traore, D. 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 221-227.

- 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.
- Bamba, S., Zoungrana, J., Nikièma, Z., Sondo, A. K., Ndiaye, J-L. & Bretagne, S. 2017. Impact of alternative treatment approach for cerebral toxoplasmosis among HIV/AIDS patients from a resource-poor setting in Burkina Faso. *Annals of Parasitology*, 63(3), 173-181.
- Barros, Fernanda Carvalho; Sagata, Érika; Ferreira, Luciano César de Castro; Juliatti, Fernando César. 2010. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. *Bioscience Journal*, 26(2):231-239.
- Barry, A., Balows, A.L., Thornsberry-Chauser, W. J., Herman, K. L., Isenberg, H. D. & Shamody, H.J. 1991. *Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures Manual of clinical microbiology*, Washington D.C., American Society for Microbiology.
- Barth, E.F., Pinto, L. S., Dileli, P., Biavattib, D. C., Silva, Y. L., Bortolucci, W., Gazima, Z. C., Takemurac, O. S., Romagnolod, M. B. & Laverde-Juniora, A. 2017. Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 78(4):601-608.
- Bednarczuk, V. O, Verdam, M. C. S. , Miguel, M. D. & Miguel, O.G. 2010. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica. *Visão Acadêmica*, 11(2):43-50.
- Blume, M. & Seeber, F. 2018. Metabolic interactions between *Toxoplasma gondii* and its host. *F1000Research*, 7:1719.
- Brandão, H. N., David, J. P., Couto, R. D., Nascimento, J. A. P. & David, J. M. 2010. Química e Farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, 33(6):1359-1369.
- 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.

- Bulus, T., Ahmed, A. B., Aboi, T. Y. & Danbaki, D. A. 2016. Determination of IC50 and IC90 Values of Ethanolic Extracts of Some Medicinal Plants against *Trypanosoma brucei brucei*. *Archives of Clinical Microbiology*, 7(3):19.
- Cabral, C., Pita, J. R. & Salgueiro, L. 2014. *Plantas Medicinais: entre o passado e o presente. A colecção de fármacos vegetais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (séculos XIX - XX)*, Coimbra, Imprensa Universidade de Coimbra.
- Câmara, J. T., Silva, M. G. & Castro, A. M. 2015. Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do Nordeste, Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 37(2):64-70.
- 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.
- Cantos, G. A., Prando, M. D., Siqueira, M. V. & Teixeira, R. M. 2000. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46(4):335-41.
- Coelho, J. M. P. 2010. *Toxoplasmose na gravidez*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Medicina na área de Ginecologia e Obstetrícia. Faculdade de Medicina Universidade do Porto.
- Coelho, I. D. 2013. *Síndrome de Stevens-johnson e necrólise epidérmica tóxica*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre no âmbito do ciclo de estudos em Mestrado Integrado em Medicina. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
- Coneglian, S. M., Lima, B. S., Silva, L. G., Lazzari, C. M., Serrano, R. D. C. & Tonello, C. L. 2011. Utilização de antioxidantes nas rações. *PUBVET*, 5(5).
- Cragg, G. M. & Newman, D. J. 2005. Drug Discovery and Development from Natural Products: The Way Forward. 11ª edição *NAPRECA Symposium Book of Proceedings*, 56-69.
- Cunha, A. P., Silva, A. P., Costa, M. C., Roque, O. R., Cunha, H. P. & Portugal, M. P. 2017. *Manual de Plantas Medicinais - Bases Farmacológicas e Clínicas*. Lisboa, Dinalivro.

- Cunha, A. P. 2014. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Castro, J. L. 1985. *Medicina Vegetal: Teoria e Prática conforme a Naturopatia*. Lisboa, Publicações Europa-América.
- CDC | Centers for Disease Control and Prevention (2018). [ONLINE] acesso em: <http://www.cdc.gov> [acedido a 4 de Janeiro de 2018].
- 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.
- Dincel, G. C., Atmaca, H. T. 2015. Nitric oxide production increases during *Toxoplasma gondii* encephalitis in mice. *Experimental Parasitology*.156:104-112.
- Diniz, M. A., Martins, E. S., Silva & O., Gomes, E. T. 2008. Diversidade dos recursos vegetais na medicina tradicional da Guiné-Bissau. Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos. IICT /CCCM, 29, 30 e 31 de Outubro de 2008
- Drugtime (2018). [ONLINE] acesso em: <https://www.drugtimes.org/medicinal-plants/antimicrobial-bioactive-phytocompounds-from-extraction-to-identification-process-standardization.html>
- Duarte, D. F. 2005. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 55(1): 135 - 146.
- Efraim, P., Alves, A. B. & Jardim, D. C. P. 2011. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian Journal Food Technology*, 14 (3):181-201.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G.W.& Walker, R.B. 2010. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14):8139-8144.

FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). [ONLINE] acesso em: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/mlt49565.pdf> [acedido a 20 de Janeiro de 2019].

Feliu, D. A. 2011. *Análise de Terpenóides de espécies Croton sect Lamprocoton (Mull. Arg.) Pax. (Euphorbiaceae)*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área da Botânica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

Ferguson, D. J. P. 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2):133-148

Ferreira, G., Canessa, A., Sampietro, F., Cruciani, M., Romussi, G. & Bassetti, D. 1993. *In vitro* activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antiviral Research*, 21(4):317-325.

Ferreira, V. F. & Pinto, A. C. 2010. A fitoterapia do mundo atual. *Química Nova*, 33(9):1829.

Ferreira, W. F. C. & Sousa, J. C. F. 2002. Microbiologia. Parte 2 - Parasitologia. Lisboa. *LIDEL*.

Filho, R. B. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, 33(1):229-239.

Firmo, W. C. A., Menezes, V. J. M., Passos, C. E. C., Dias, C. N., Alves, L. P. L., Dias, I. C. L., Neto, M. N. & Olea, R. S. G. 2011. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cadernos de Pesquisa*, 18:90-95.

Foglio, M. A., Queiroga, C. L., Sousa, I. M. O. & Rodrigues, R. A. F. 2006. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *MultiCiência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp*.

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

Fonseca, M. M. & Teixeira, J. A. 2007. *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*, Lisboa, LIDEL - edições técnicas, Lda.

- Franco, P. S., Gomes, A. O., Barbosa, B. F., Angeloni, M. B., Silva, N. M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Silva, D. A., Mineo, J. R., Ferro, E. A. 2011. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. *Placenta*, 32(11):838-44.
- Fumagali, E. *et al.* 2008. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4):627-641
- Galdino, A. G. S., Oliveira, E. M., Filippin-Monteiro, F. B. & Zavaglia, C. A. C. 2014. Análise de ensaios in vitro do compósito de 50% HA-50% TiO₂ fabricados pelo método da esponja polimérica. *Cerâmica*, 60(356):586-593.
- Ganapaty, S., Steve, T. P., Karagianis, G., Waterman, P. G. & Brun, R. 2006. Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. *Phytochemistry*, 67(17):1950-6.
- Garcia, J. L., Innes, E. A. & Katzer, F. 2014. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine: Development and Therapy*, 4:23–37.
- García, A. Á. & Carril, E. P.-U. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2 (3): 119-145.
- Gonçalves, J. A. 2011. *O circuito do medicamento: da molécula à farmácia*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde, Porto.
- Goodman, C. D., Austarheim, I., Mollard, V., Mikolo, B., Malterud, K. E., McFadden, G. I. & Wangenstein, H. 2016. Natural products from *Zanthoxylum heitzii* with potent activity against the malaria parasite. *Malaria Journal*, 15:481.
- Gurib-Fakim, A. 2005. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1):1-93.
- Hata, Y., Ebrahimi, S. N., De Mieri, M., Zimmermann, S., Mokoka, T., Naidoo, D., Fouche, G., Maharaj, V., Kaiser, M., Brun, R., Potterat, O. & Hamburger, M. 2014. Antitrypanosomal isoflavan quinones from *Abrus precatorius*. *Fitoterapia*, 93:81-7.

- Havik, P. J. 2016. Hybridising Medicine: Illness, Healing and the Dynamics of Reciprocal Exchange on the Upper Guinea Coast (West Africa). *Medical History*, 60(2):181–205.
- 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.
- Ho, S. C., Tang, Y. L., Lin, S. M. & Liew, Y. F. 2010. Evaluation of peroxynitrite-scavenging capacities of several commonly used fresh spices. *Food Chemistry*, 119(3): 1102-1107
- Huang, D. J., Ou, B. X. & Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):1841-1856.
- IBRA | Instituto Brasileiro de Análises (2018). [ONLINE] acesso em: <http://www.ibra.com.br/soloeplanta> [acedido a 20 de Fevereiro de 2018].
- Indjai, B., Catarino, L. & Mourão, D. 2010. Mezinhos de Orango – Plantas medicinais e pessoas da ilha da Rainha Pampa. Bissau, IBAP.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4):1821-1835.
- Jin, C., Kaewintajuk, K., Jiang, J., Jeong, W., Kamata, M., Kim, H. S., Wataya, Y. & Park, H. 2009. *Toxoplasma gondii*: a simple high-throughput assay for drug screening *in vitro*. *Experimental Parasitology*, 121(2):132-136.
- Júnior, N. O. R., Fernandez, L. G., Castro, R. D., Silva, L. C., Gualberto, S. A., Pereira, M. L. A. & Silva, M. V. 2011. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. *Brazilian Journal Food Technology*, 14(1):50-57.
- 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., Spatara, 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.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2):2328-75.
- Klaassen, C. D. & Watkins III, J. B. 2001. *Toxicologia: A Ciência Básica dos Tóxicos de Casarett e Doull*, Amadora, McGraw-Hill de Portugal.
- 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.
- Levitov, A. B., Dallas, A. P. & Slonim, A. D. 2013. *Bioquímica Ilustrada de Harper*. Porto Alegre, AMGH Editora.
- Lima, J. J. F. 2010. Plantas e Dor. Contributo para o Estudo Etnoantropológico do Tratamento da Dor. *DOR*. 5-18.
- Limmatvapirat, C., Sirisopanaporn, S. & Kittakoop, P. 2004. Antitubercular and antiplasmodial constituents of *Abrus precatorius*. *Planta Medica*, 70(3):276-8.
- Lisboa, M., Brito, T., Rosa, R., Santos, A., Domingues, I. & Ferreira, P. 2013. Toxoplasmose Ocular Primária. *Revista da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia*, 37(2):133-138.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. & Schubert, D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69:581-593.
- Lobo, M. L., Patrocinio, G., Sevivas, T., Sousa, B. & Matos, O. 2017. Portugal and Angola: similarities and differences in *Toxoplasma gondii* seroprevalence and risk factors in pregnant women. *Epidemiology and Infection*, 145(1):30 –40.

- Lopes, A. P., Dubey, J. P., Dardé, M.-L. & Cardoso, L. 2014. Epidemiological review of *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in Portugal. *Parasitology*, 141(13):1699-1708.
- MacDonald, J. A. 1995. Medicinal Plants Exploration – Past and Present. *Arnoldia*, 3-12.
- Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S. & Lima, J. L.F.C. 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83: 441-447.
- Mamman, I., & Isa, M. 2013. Phytochemical and Antibacterial Activity of Leave Extracts of *Guiera Senegalensis* Lam on Selected Species of Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *International Journal of Environment*, 2(1):262-268.
- Mancini, D. T., Assis, L. C., Ramalho, T. C., Cunha, E. F. F. & França, T. C. C. 2012. Toxoplasmose: Perspectivas no Estudo de Novos Alvos Terapêuticos. *Revista Virtual Química*, 4 (4):434-455.
- Martins, C. M. 2012. *Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc (Pau-Santo) do Cerrado*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química.
- McFarland, J. 1907. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14:1176-1178.
- Mezzomo, N. 2008. *Óleo de amêndoa de pêssego: avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Miranda, G. S., Souza, S. R., Amaro, M. O. F., Rosa, M. B. & Carvalho, C. A. 2013. Avaliação do conhecimento etnofarmacológico da população de Teixeira - MG, Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(4):559-563.

- Misra, L. N., Wouatsa, N.A., Kumar, S., Venkatesh, K. R. & Tchoumboungang, F. 2013. Antibacterial, cytotoxic activities and chemical composition of fruits of two Cameroonian *Zanthoxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1):74-80.
- Mitsuka-Breganó, R., Lopes-Mori, F. M. R. & Navarro, I. T. 2010. *Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas*. Londrina: EDUEL.
- Mohanraj, K., Karthikeyan, B. S., Vivek-Ananth, R. P., Chand, R. P., Aparna, S. R., Mangalapandi, P. & Samal, A. 2018. IMPPAT: A curated database of Indian Medicinal Plants, Phytochemistry and Therapeutics. *Scientific Reports*. 8:4329
- Morales, R. 1996. Farmacología y farmacognósia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica. *Monografías del Jardín Botánico de Córdoba*, 3: 93-98.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, 65:55- 63.
- 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.
- Nakamura, T., Silva, F. S., Silva, D. X., Souza, M. W. & Moya, H. D. 2013. Determinação da atividade antioxidante e do teor total de polifenol em amostras de chá de ervas comercializadas em sachets. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde Health Sciences*, 38(1):8-16.
- NCCLS. 2003. *National Comittee for Clinical Laboratory Standards. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão*: Noma aprovada- oitava edição. Documento M2 - A8, 23(1).
- Nemati, F., Dehpouri, A. A., Eslami, B., Mahdavi, V., Mirzanejad, S. 2013. Cytotoxic Properties of Some Medicinal Plant Extracts from Mazandaran, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(11): e8871.
- Neto, J. D. N., Sousa, D. P. & Freitas, R. M. 2013. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(1):125-130.

- Olajide, O. A., Makinde, J. M. & Okpako, D. T. 2003. Evaluation of the anti-inflammatory property of the extract of *Combretum micranthum* G. Don (Combretaceae). *Inflammopharmacology*, 11(3):293-8.
- Olasehinde, G. I., Ojurongbe, O., Adeyeba, A. O., Fagade, O. E., Valecha, N., Ayanda, I. O., Ajayi, A. A. & Egwari, L. O. 2014. *In vitro* studies on the sensitivity pattern of *Plasmodium falciparum* to anti-malarial drugs and local herbal extracts. *Malaria Journal*, 13:63.
- Oliveira, O. B., Havik, P. J. & Schiefer, U. 1993. *Armazenamento Tradicional da Guiné-Bissau: produtos, sementes e celeiros utilizados pelas etnias da Guiné-Bissau*. Bissau & Lisbon & Munster, IFS & COPIN.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O. & Freitas, B. R. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 301-307.
- Oyenihi, A. B. & Smith C. 2019. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success?, *Journal of Ethnopharmacology*, 30(229):54-72.
- 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*, 1-25.
- Pereira, R. J. P. & Cardoso, M. G. 2012. Metabolitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(4):146-152
- Petrovska, B. B. 2012. Historical review of medicinal plant's usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11): 1–5.
- Petrovska, B. B. & Cekovska, S. 2010. Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacognosy Reviews*, 4(7): 106–110.
- Pombo, E. B. P. 2011. *Estudo da actividade antibacteriana dos óleos essenciais Schinus molle*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica . Universidade da Beira Interior, Ciências Sociais e Humanas

- 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.
- PubChem Compound Database. National Center for Biotechnology Information (2018). [ONLINE] acesso em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [acedido a 30 de Março de 2018].
- Rauf, A., Uddin, G., Patel, S., Khan, A., Halim, S. A., Bawazeer, S., Ahmad, K., Muhammad, N. & Mubarak, M. S. 2017. *Diospyros*, an under-utilized, multi-purpose plant genus: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91:714-730.
- Rodrigues, T. S., Guimarães, S. F., Rodrigues-das-Dôres, R. G. & Gabriel, J.V. 2011. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 13:587-590.
- Romeiras, M. M., Duarte, M. C., Indjai, B. & Catarino, L. 2012. Medicinal Plants Used to Treat Neurological Disorders in West Africa: A Case Study with Guinea-Bissau Flora. *American Journal of Plant Sciences*, 3:1028-1036.
- Rogero, S. O., Lugão, A. B., Ikeda, T. I & Cruz, Á. S. 2003. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, 6(3):317-320.
- Roitt, I. & Brostoff, J.; Male, D. 2003. *Imunologia*; SP-Brasil, Manole.
- Rozzato, M. R. 2012. *Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
- Sanchez-Rangel, J. C. *et al.* 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21):5990-5999.

- Saini, A. 2016. Physicians of ancient India. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 5:254-8.
- Saini, P., Mukherjee, N., Mukherjee, S., Roy, P., Gayen, P., Kumar, D., Pal, B. C. & Babu, S. P. 2015. *Diospyros perigrena* bark extract induced apoptosis in filarial parasite *Setaria cervi* through generation of reactive oxygen species. *Pharmaceutical of Biology*, 53(6):813-23.
- Sakee, U., Maneerat, S., Cushnie, T. P. T. & De-eknamkul, W. 2011. Antimicrobial activity of *Blumea balsamifera* (Lin.) DC. extracts and essential oil. *Natural Product Research*. 25(19):1849-1856.
- Salawu, O. A., Tijani, A. Y., Babayi, H., Nwaeze, A. C., Anagbogu, R.A. & Agbakwuru, V. A. 2010. Anti-malarial activity of ethanolic stem bark extract of *Faidherbia albida* (Del) a. Chev (Mimosoidae) in mice. *Archives of Applied Science Research*, 2 (5):261-268.
- Sales, M. D. C., Sartor, E. B. & Gentili, R. M. L. 2015. Etnobotânica e etnofarmacologia: medicina tradicional e bioprospecção de fitoterápicos. *SALUS Journal of Health Sciences*, 1(1): 17-26.
- Santos, M. P. 2014. *Extração e caracterização de extrato de Jatropha gossypifolia L. Avaliação de sua atividade antimicrobiana e antioxidante*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa área departamental de Engenharia Química (ISEL).
- 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 Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1):1-10.
- 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.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152-178.

- Silva, D. C., Cerchiaro, G. & Honório, K. M. 2011. Relações Patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Química Nova*, 34(2):300-305.
- Silva, L. C. N. 2014. *Plantas medicinais da Guiné-Bissau: estudo da sua atividade biológica e caracterização química*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas. Universidade Nova de Lisboa e Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Sykes, P. 2009. The Edwin Smith Papyrus (ca. 16th Century BC). *Annals of Plastic Surgery*, 62(1):3-4.
- Sournia, J. C. 1992. *História de Medicina*, Lisboa, Instituto Piaget.
- Tataranno, M. L., Perrone, S., Longini, M. & Buonocore, G. 2015. New antioxidant drugs for neonatal brain injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-13.
- Teles, K. I., Belo, L. L. A. & Silva, H. M. 2017. Efeitos da alimentação na evolução humana: uma revisão. *Conexão Ci.*, 12(3):93-105.
- Tijani, A. Y., Uguru, M. O., Salawu, O. A., Abubakar, A., Onyekwelu, N. O. & Akingbasote, J. A. 2009. Effect of *Faidherbia albida* on some biochemical parameters of rat infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(1):26-30.
- Touré, A., Xu, X., Michel, T. & Bangoura, M. 2011. In vitro antioxidant and radical scavenging of Guinean kinkeliba leaf (*Combretum micranthum* G. Don) extracts. *Natural Product Reserach*, 25(11):1025-36.
- 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.
- Van, M. J., Kasper, G. J. & Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods. Molecular Biology*, 731:237-245.
- Vargas, A., López, M., Lillo, C. & Vargas, M. J. 2012. El papiro de Edwin Smith y su transcendencia médica y odontológica. Historia de la medicina. *Revista médica de Chile*, 140:1357-1362.

- Viegas, Jr. C., Bolzani, V. S. & Barreiro, E. J. 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29(2):326-337.
- WHO | World Health Organization (2018). [ONLINE] acesso em: http://www.who.int/hiv/topics/arv/cotrimoxazole_factsheet_dec2014/es/ [acedido a 10 de Junho de 2018].
- Wink, M. 2010. *Biochemistry of plant secondary metabolism*, Reino Unido, Blackwell Publishing Ltd..
- Yadav, A.K. & Tangpu, V. 2009. Therapeutic efficacy of *Zanthoxylum rhetsa* DC extract against experimental *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) infections in rats. *Journal of Parasitic Diseases*, 33(1-2):42-7.
- Yang, Y., Hayden, M. R., Sowers, S., Bagree, S. V. & Sowers, J. R. 2010. Retinal redox stress and remodeling in cardiometabolic syndrome and diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(6):392-403.
- Yan, X., Ji, Y., Liu, X. & Suo, X. 2015. Nitric oxide stimulates early egress of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from Human foreskin fibroblast cells. *Parasites & Vectors*, 8:420.
- 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 1

Tabela 8 - Registro da reação de inibição, do diâmetro dos halos de inibição e classificação da estirpe bacteriana na presença de extrato em metanol e extratos fracionados

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra		Reação de inibição					Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estirpe bacteriana					
		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
<i>Ficus polita</i> (folha) nº1	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F5	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
<i>Psychotrya peduncularis</i> (folha) nº7	F5	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F5	-	-	+	+	-	0	0	0	5	0	0	0	R	R	I	R
	F6	-	-	+	+	-	0	0	0	8	0	0	0	R	R	I	R
<i>Combretum micratum</i> (folha) nº8	F7	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F8	-	-	+	+	-	0	0	0	8	0	0	0	R	R	I	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	-	-	+	-	+	0	0	0	8	0	0	7	R	R	I	R
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F5	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F7	-	-	+	+	-	0	0	0	8	0	0	0	R	R	R	R
	F8	-	-	+	+	-	0	0	0	7	0	0	0	R	R	I	R
<i>Strophanthus sarmentosus</i> (ramo) nº13	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	8	0	0	7	R	R	I	R
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F5	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	10	0	R	R	R	I
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	10	0	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	10	0	R	R	R	I
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	9	0	R	R	R	I

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Reação de inibição					Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estipe bacteriana				
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Cassia filiformis</i> (ramo) nº10	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	9	9	9	6	20	S	I	I	I	I
	F5	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	+	-	0	0	8	0	0	R	R	I	R	R
<i>Abrus precatorius</i> (folha) nº17Fo	F5	+	-	+	-	4	0	8	0	10	I	R	I	R	I
	F6	+	-	+	-	5	0	8	0	5	I	R	I	R	I
	F7	-	-	+	-	0	0	7	0	5	R	R	I	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	10	10	9	8	20	S	I	I	S	I
	F5	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Abrus precatorius</i> (ramo) nº17Ra	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	11	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	+	-	0	0	5	0	0	R	R	I	R	R
	Metanol	+	-	-	-	7	0	0	0	7	S	R	R	R	I
	F4	+	+	+	+	6	9	9	6	20	S	I	I	I	I
	F5	+	-	-	-	5	0	0	0	7	I	R	R	R	I
	F6	+	-	-	-	5	0	0	0	7	I	R	R	R	I
	F7	+	-	-	-	5	0	0	0	8	I	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	4	R	R	R	R	I
<i>Abrus precatorius</i> (raiz) nº2356Rz	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	+	-	-	-	7	0	0	0	7	S	R	R	R	I
	F4	+	+	+	+	6	9	9	6	20	S	I	I	I	I
	F5	+	-	-	-	5	0	0	0	7	I	R	R	R	I
	F6	+	-	-	-	5	0	0	0	7	I	R	R	R	I
	F7	+	-	-	-	5	0	0	0	8	I	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	4	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Reação de inibição					Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estipe bacteriana				
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Khaya senegalensis</i> (folha) nº22	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	+	0	0	0	0	11	R	R	R	R	I
	F5	-	-	-	+	0	0	0	0	8	R	R	R	R	I
	F6	+	-	-	+	4	0	0	0	8	I	R	R	R	I
	F7	+	-	-	+	4	0	0	0	8	I	R	R	R	I
	F8	-	-	-	+	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	+	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Faidherbia albida</i> (folha) nº23	F5	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F5	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Cnestis ferruginea</i> (folha) nº24	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F5	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Cnestis ferruginea</i> (folha) nº25	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	-	+	-	5	0	6	0	8	I	R	I	R	I
	F5	+	-	+	-	6	0	8	0	9	S	R	I	R	I
	F6	+	-	+	-	5	0	8	0	9	I	R	I	R	I
	F7	+	-	+	-	5	0	7	0	8	I	R	I	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Hymenocardia acida</i> (folha) nº27	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	-	+	-	5	0	6	0	8	I	R	I	R	I
	F5	+	-	+	-	6	0	8	0	9	S	R	I	R	I
	F6	+	-	+	-	5	0	8	0	9	I	R	I	R	I
	F7	+	-	+	-	5	0	7	0	8	I	R	I	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	-	+	-	5	0	6	0	8	I	R	I	R	I

		Reação de inibição					Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estipe bacteriana				
Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Calyptrorchilum christyanum</i> (folha) nº35	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F5	-	-	+	-	+	0	0	7	0	9	R	R	I	R	I
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	+	0	0	0	0	11	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	+	+	+	+	0	6	4	4	17	R	I	I	I	I
<i>Calyptrorchilum christyanum</i> (raiz) nº292	F5	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	+	0	0	0	0	10	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	+	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	F4	+	-	-	-	+	6	0	0	0	6	S	R	R	R	I
	F5	+	-	+	-	+	7	0	8	0	7	S	R	I	R	I
	F6	+	-	+	-	+	6	0	7	0	5	S	R	I	R	I
<i>Trichilia pruriens</i> subespécie <i>pruriens</i> (folha) nº5/19	F7	+	-	+	-	+	7	0	8	0	6	S	R	I	R	I
	F8	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	+	6	0	0	0	6	S	R	R	R	I
	F5	-	-	+	-	+	7	0	8	0	7	S	R	I	R	I
	F6	-	-	+	-	+	6	0	7	0	5	S	R	I	R	I
	F7	-	-	+	-	+	7	0	8	0	6	S	R	I	R	I
	F8	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
<i>Margaritaria discoidea</i> (folha) nº6/29	F9	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	+	0	0	0	0	4	R	R	R	R	I
	F5	+	-	+	-	+	5	0	8	0	10	I	R	I	R	I
	F6	+	-	+	-	+	6	0	7	0	10	S	R	I	R	I
	F7	+	-	-	-	+	5	0	0	0	9	I	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I

		Reação de inibição				Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estipe bacteriana					
Espécie/ Parte utilizada da planta/ n° amostra	Extração	B. cereus ATCC 11778	E. coli ATCC 29922	E. faecalis ATCC 25912	P. aeruginosa ATCC 27853	S. aureus ATCC 25923	B. cereus ATCC 11778	E. coli ATCC 29922	E. faecalis ATCC 25912	P. aeruginosa ATCC 27853	S. aureus ATCC 25923	B. cereus ATCC 11778	E. coli ATCC 29922	E. faecalis ATCC 25912	P. aeruginosa ATCC 27853	S. aureus ATCC 25923
Ocimum gratissimum (folha) n°15/37	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	+	0	0	0	0	10	R	R	R	R	I
	F5	-	-	-	-	+	0	0	0	0	11	R	R	R	R	I
	F6	-	-	-	-	+	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	F7	-	-	-	-	+	0	0	0	0	8	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	+	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	4	R	R	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	+	7	4	7	6	17	S	I	I	I	I
Allophylus africans (folha) n°26/32	F5	+	-	+	-	+	5	0	5	0	10	I	R	I	R	I
	F6	+	-	-	-	+	4	0	0	0	7	I	R	R	R	I
	F7	-	-	+	-	+	0	0	7	0	10	R	R	I	R	I
	F8	-	-	-	-	+	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	F9	-	-	-	-	+	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	-	+	+	+	4	0	6	5	16	I	R	I	I	I
	F5	-	-	-	-	+	0	0	0	0	10	R	R	R	R	I
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
Leptadenia hastata (folha) n°33/28/34	F7	-	-	-	-	+	0	0	0	0	10	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	+	4	7	4	8	17	I	I	I	S	I
	F5	+	-	-	-	-	5	0	0	0	0	I	R	R	R	R
	F6	+	-	-	-	+	5	0	0	0	7	I	R	R	R	I
	F7	+	-	-	-	-	4	0	0	0	0	I	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
Zanthoxylum lepreuri (folha) n°2303Rz	F9	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	5	R	R	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	+	4	7	4	8	17	I	I	I	S	I
	F5	+	-	-	-	-	5	0	0	0	0	I	R	R	R	R
	F6	+	-	-	-	+	5	0	0	0	7	I	R	R	R	I
	F7	+	-	-	-	-	4	0	0	0	0	I	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R

		Reação de inibição					Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estipe bacteriana				
Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Extração	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Zanthoxylum lepreurii</i> (raiz) nº2303Fo	Metanol	+	-	-	-	+	9	0	0	0	9	S	R	R	R	I
	F4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	F5	+	-	-	-	+	9	0	0	0	8	S	R	R	R	I
	F6	+	-	-	-	+	9	0	0	0	9	S	R	R	R	I
	F7	+	+	-	-	+	1	7	0	0	11	R	I	R	R	I
	F8	+	+	-	-	+	8	5	0	0	10	S	I	R	R	I
	F9	+	+	-	-	+	8	5	0	0	10	S	I	R	R	I
	F10	+	+	-	-	+	7	5	0	0	8	S	I	R	R	I
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Diospyros heudelotii</i> (casca) nº2349Ca	F5	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	+	7	10	9	6	20	S	I	I	I	I
	F5	-	-	-	-	+	0	0	0	0	10	R	R	R	R	I
	<i>Diospyros heudelotii</i> (folha) nº2349Fo	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R
F7		-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
F8		-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
F9		-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
F10		-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
Metanol		-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
F4		-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
F5		-	-	-	-	+	0	0	0	0	13	R	R	R	R	I
F6		-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (casca) nº2372Ca		F7	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F5	-	-	-	-	+	0	0	0	0	13	R	R	R	R	I
	F6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Reação de inibição					Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estipe bacteriana				
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (folha) nº2372Fo	Metanol	-	-	-	-	-	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	7	7	9	10	20	S	I	I	S	I
	F5	-	-	-	-	0	0	0	0	10	R	R	R	R	I
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	9	R	R	R	R	I
	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	8	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	-	+	-	4	0	7	0	19	I	R	I	R	I
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (raiz) 2372Rz	F5	-	-	-	-	0	0	0	0	18	R	R	R	R	I
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	5	4	8	5	16	I	I	I	I	I
	F5	+	-	-	-	4	0	0	0	10	I	R	R	R	I
	F6	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Sorindeia juglandifolia</i> (folha) nº2399Fo	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	7	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	6	5	7	6	17	S	I	I	I	I
	F5	+	-	-	-	6	0	0	0	10	S	R	R	R	I
	F6	+	-	-	-	5	0	0	0	10	I	R	R	R	I
	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
<i>Guiera senegalensis</i> (folha) nº2400Fo	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	Metanol	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F4	+	+	+	+	6	5	7	6	17	S	I	I	I	I
	F5	+	-	-	-	6	0	0	0	10	S	R	R	R	I
	F6	+	-	-	-	5	0	0	0	10	I	R	R	R	I
	F7	-	-	-	-	0	0	0	0	6	R	R	R	R	I
	F8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	F10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R

Espécie/ Parte utilizada da planta/ nº amostra	Reação de inibição					Diâmetro do halo de inibição (mm)					Classificação da estipe bacteriana				
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 29922	<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (folha) n°2404Fo	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	+	-	+	+	+	5	0	6	6	16	I	R	I	I	I
	+	-	-	-	+	5	0	0	0	18	I	R	R	R	I
	-	-	-	-	+	0	0	0	0	11	R	R	R	R	I
	-	-	-	-	+	0	0	0	0	18	R	R	R	R	I
	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R
	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	R	R	R	R	R

Anexo 2

Tabela 9 - Polifenóis diluição 1:10

Nº Amostra	Concentração (mg/ml)	Abs 1H	Abs 2H	Total de Fenois 1H	Total de fenois 2H
8	1	2,1415	2,1846	1023,2	991,6
	0,1	1,2747	1,4076	589,8	621,6
	0,01	0,6109	0,7026	257,9	285,9
	0,001	0,2720	0,3063	88,5	97,1
10	1	2,2251	2,3253	1065,0	1058,6
	0,1	0,6591	0,7341	282,0	300,9
	0,01	0,3723	0,4183	138,6	150,5
	0,001	0,1725	0,1880	38,7	40,8
2303Fo	1	3,3532	3,3865	1629,1	1563,9
	0,1	0,8364	0,9061	370,7	382,8
	0,01	0,2357	0,2569	70,4	73,6
	0,001	0,0854	0,0936	-4,8	-4,1
2303Rz	1	3,1558	3,3095	1530,4	1527,2
	0,1	0,8529	0,9280	379,0	393,2
	0,01	0,2912	0,3163	98,1	101,9
	0,001	0,1045	0,1119	4,7	4,6
2349Ca	1	2,3799	2,5422	1142,4	1161,8
	0,1	1,6078	1,7036	756,4	762,5
	0,01	0,6159	0,6601	260,4	265,6
	0,001	0,3335	0,3469	119,3	116,5
2356Rz	1	2,2780	2,3931	1091,5	1090,8
	0,1	0,5292	0,5790	217,1	227,0
	0,01	0,1942	0,2188	49,6	55,5
	0,001	0,0852	0,0877	-4,9	-6,9
2372Ca	1	1,8650	1,9794	885,0	893,9
	0,1	0,6492	0,7214	277,1	294,8
	0,01	0,2255	0,2478	65,2	69,3
	0,001	0,1183	0,1590	11,6	27,0
2399Fo	1	1,8195	1,9585	862,2	883,9
	0,1	0,5136	0,5603	209,3	218,1
	0,01	0,1881	0,2028	46,6	47,8
	0,001	0,0890	0,0951	-3,0	-3,4
2400Fo	1	2,1722	2,2863	1038,6	1040,0
	0,1	0,7165	0,8097	310,8	336,8
	0,01	0,2510	0,2754	78,0	82,4
	0,001	0,1294	0,1367	17,2	16,4

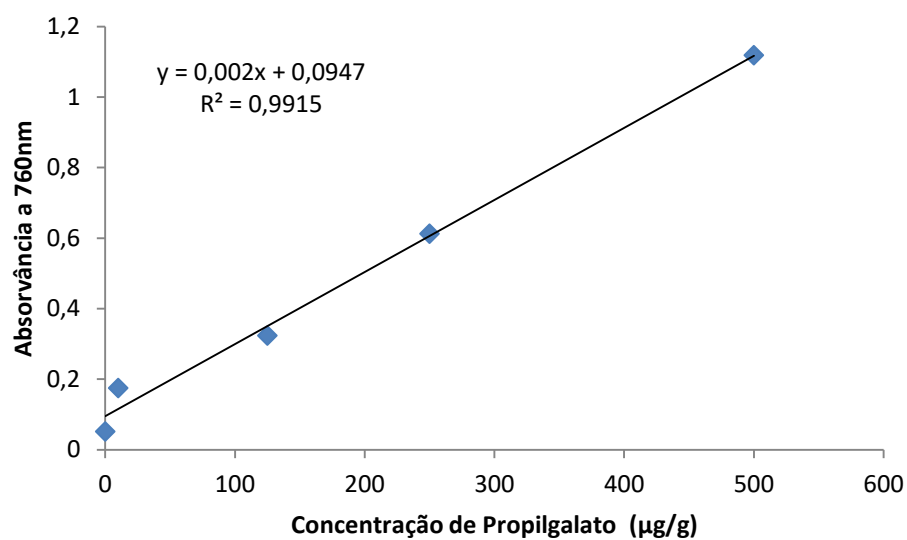


Figura 31 - Curva de calibração obtida durante a primeira hora (1h) para determinar a concentração em mg/g equivalentes a propilgalato de sódio (EPG).

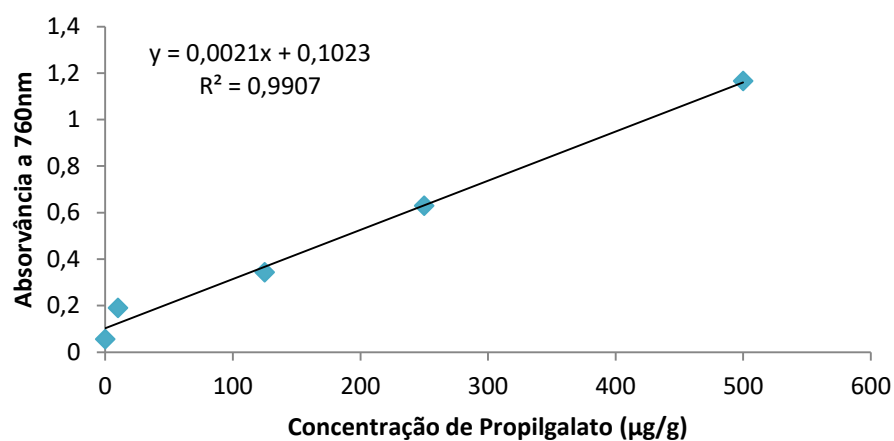


Figura 32 - Curva de calibração obtida durante a segunda hora (2h) para determinar a concentração em mg/g equivalentes a propilgalato de sódio (EPG).

Anexo 3

Tabela 10 - Determinação da actividade de inibição a partir da leitura de absorvâncias a 546nm

Nº Amostra	Concentração (mg/ml)	Abs (nm)	Atividade inibição (%)
1	0,2	1,3240	6,0
	0,1	1,3685	2,8
	0,05	1,3671	2,9
	0	1,4084	0,0
7	0,2	0,6254	25,4
	0,1	0,7514	10,3
	0,05	0,7262	13,3
	0	0,8379	0,0
8	0,2	0,4754	0,5
	0,1	0,8581	0,9
	0,05	1,0615	1,1
	0	1,1156	1,1
10	0,2	0,3820	35,9
	0,1	0,4674	21,5
	0,05	0,5042	15,4
	0	0,5956	0,0
13	0,2	1,1443	24,1
	0,1	1,3644	9,4
	0,05	1,4269	5,3
	0	1,5067	0,0
17Fo	0,2	0,6809	42,7
	0,1	0,9154	23,0
	0,05	0,9487	20,2
	0	1,1893	0,0
17Ra	0,2	0,6064	31,5
	0,1	0,6981	21,1
	0,05	0,8251	6,8
	0	0,8851	0,0
2356Rz	0,2	0,6976	44,6
	0,1	1,0867	13,6
	0,05	1,2548	0,3
	0	1,2582	0,0
22	0,2	0,5373	31,6
	0,1	0,6423	18,2
	0,05	0,7481	4,7
	0	0,7853	0,0
23	0,2	0,6981	11,9
	0,1	0,6694	15,5
	0,05	0,7625	3,7
	0	0,7922	0,0
24	0,2	0,5909	20,5
	0,1	0,6354	14,5
	0,05	0,6966	6,3

Nº Amostra	Concentração (mg/ml)	Abs (nm)	Atividade inibição (%)
	0	0,7433	0,0
27	0,2	0,5625	14,2
	0,1	0,5792	11,7
	0,05	0,6333	3,4
	0	0,6558	0,0
35	0,2	0,7004	-10,3
	0,1	0,6356	-0,1
	0,05	0,6458	-1,7
	0	0,6349	0,0
2292	0,2	0,4411	28,7
	0,1	0,4759	23,1
	0,05	0,4515	27,0
	0	0,6188	0,0
5/19	0,2	0,7658	-6,2
	0,1	0,5932	17,7
	0,05	0,6063	15,9
	0	0,7209	0,0
6/29	0,2	0,6930	-7,8
	0,1	0,5729	10,8
	0,05	0,5674	11,7
	0	0,6426	0,0
15/37	0,2	0,6446	-15,1
	0,1	0,5658	-1,1
	0,05	0,5595	0,1
	0	0,5599	0,0
26/32	0,2	0,5738	2,0
	0,1	0,6578	-12,3
	0,05	0,6299	-7,5
	0	0,5858	0,0
2303Rz	0,2	0,9805	21,4
	0,1	1,1109	11,0
	0,05	1,1990	3,9
	0	1,2482	0,0
2303Fo	0,2	2,1085	-40,0
	0,1	1,2786	-1,0
	0,05	1,2146	4,1
	0	1,2660	0,0
2349Ca	0,2	0,6168	50,4
	0,1	0,9648	22,4
	0,05	1,1990	3,6
	0	1,2439	0,0
2349Fo	0,2	0,8972	0,9
	0,1	1,0762	1,1
	0,05	1,0754	1,1
	0	1,1185	1,1

Nº Amostra	Concentração (mg/ml)	Abs (nm)	Atividade inibição (%)
2372Ca	0,2	0,9143	24,8
	0,1	1,0975	9,8
	0,05	1,2377	-1,8
	0	1,2162	0,0
2372Fo	0,2	1,1941	1,2
	0,1	1,1408	1,1
	0,05	1,1484	1,1
	0	1,2080	1,2
2372Rz	0,2	1,0512	12,3
	0,1	1,2137	-1,3
	0,05	1,2494	-4,3
	0	1,1982	0,0
2399Fo	0,2	0,8418	29,5
	0,1	1,0899	8,8
	0,05	1,2103	-1,3
	0	1,1947	0,0
2400Fo	0,2	0,7494	41,5
	0,1	1,0764	16,0
	0,05	1,2326	3,9
	0	1,2820	0,0
2404Fo	0,2	1,0803	1,1
	0,1	1,0787	1,1
	0,05	1,0815	1,1
	0	1,1124	1,1

Tabela 11 - Determinação do IC₅₀ (µg/ml) de acordo com a sua actividade de inibição

Nº amostra	IC ₅₀	Atividade inibição (%)	Desvio padrao
1	1,8	6,0	0,050753
7	0,42	25,4	0,397336
8	0,18	0,5	0,018757
10	0,27	35,9	0,058916
13	0,42	24,1	0,061682
17Fo	0,23	42,7	0,289634
17Ra	0,3	31,5	0,054797
2356Rz	0,24	44,6	0,039742
22	0,31	31,6	0,037856

Nº amostra	IC₅₀	Atividade inibição (%)	Desvio padrao
23	0,75	11,9	0,065192
24	0,47	20,5	0,019404
27	0,66	14,2	0,033267
35	-0,97	0,0 *	0,032551
2292	0,35	28,7	0,049036
5/19	-0,79	0,0 *	0,05469
6/29	-0,77	0,0 *	0,032296
15/37	-0,6	0,0 *	0,036907
26/32	3,4	2,0	0,017121
2303Rz	0,46	21,4	0,02289
2303Fo	-0,19	0,0 *	0,042208
2349Ca	0,2	50,4	0,019264
2349Fo	0,53	0,9	0,042177
2372Ca	0,39	24,8	0,026318
2372Fo	76,27	1,2	0,025153
2372Rz	0,78	12,3	0,017879
2399Fo	0,34	29,5	0,022725
2400Fo	0,25	41,5	0,031714
2404Fo	4,13	1,1	0,012805

Anexo 4

Tabela 12 - Inibição dos extratos em células VERO e IC₅₀

Nº amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células VERO Sobrevividas (%)	Cel. VERO Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
1	1	0,4973	99,5027	0,69
	0,5	97,2199	2,780101	
	0,25	110,3282	-10,3282	
	0,125	104,9038	-4,90384	
7	1	3,952621	96,04738	0,75
	0,5	115,4396	-15,4396	
	0,25	110,6941	-10,6941	
	0,125	106,8012	-6,80125	
8	1	13,62828	86,37172	0,81
	0,5	118,7742	-18,7742	
	0,25	110,9469	-10,9469	
	0,125	106,839	-6,83897	
10	1	3,088791	96,91121	0,67
	0,5	90,64498	9,355018	
	0,25	94,61332	5,386679	
	0,125	105,2245	-5,22448	
13	1	2,885093	97,11491	0,62
	0,5	56,46898	43,53102	
	0,25	102,3501	-2,35007	
	0,125	118,3668	-18,3668	
17Fo	1	1,312092	98,68791	0,64
	0,5	74,44722	25,55278	
	0,25	97,99697	2,003028	
	0,125	111,856	-11,856	
17Ra	1	1,036722	98,96328	0,6

Nº amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células VERO Sobrevividas (%)	Cel. VERO Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
	0,5	71,02584	28,97416	
	0,25	81,91992	18,08008	
	0,125	104,2324	-4,23239	
22	1	3,198184	96,80182	0,68
	0,5	90,68648	9,313524	
	0,25	97,61598	2,384021	
	0,125	109,3512	-9,35125	
23	1	1,951477	98,04852	0,24
	0,5	1,962794	98,03721	
	0,25	5,470926	94,52907	
	0,125	111,5297	-11,5297	
24	1	2,164606	97,83539	0,62
	0,5	71,84064	28,15936	
	0,25	97,36324	2,636757	
	0,125	100,0113	-0,01132	
27	1	3,228362	96,77164	0,71
	0,5	100,7544	-0,75444	
	0,25	107,601	-7,60095	
	0,125	105,0132	-5,01324	
35	1	2,179694	97,82031	0,73
	0,5	101,2863	-1,28631	
	0,25	121,9315	-21,9315	
	0,125	123,8213	-23,8213	
5/19	1	0,685909	99,31409	0,66
	0,5	69,61127	30,38873	
	0,25	114,4173	-14,4173	

Nº amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células VERO Sobrevividas (%)	Cel. VERO Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
	0,125	123,4102	-23,4102	
6/29	1	0,70477	99,29523	0,57
	0,5	67,90625	32,09375	
	0,25	77,86859	22,13141	
	0,125	96,78232	3,217675	
15/37	1	0,678365	99,32164	0,66
	0,5	81,7049	18,2951	
	0,25	100,5206	-0,52056	
	0,125	117,5972	-17,5972	
26/32	1	1,987313	98,01269	0,74
	0,5	107,4463	-7,44629	
	0,25	119,4418	-19,4418	
	0,125	125,7263	-25,7263	
2292	1	2,711572	97,28843	0,72
	0,5	103,6024	-3,60244	
	0,25	110,9507	-10,9507	
	0,125	112,0936	-12,0936	
2303Fo	1	-1,30203	101,302	0,43
	0,5	1,315864	98,68414	
	0,25	98,10259	1,897407	
	0,125	83,53818	16,46182	
2303Rz	1	2,79456	97,20544	0,29
	0,5	3,266084	96,73392	
	0,25	43,83216	56,16784	
	0,125	88,86451	11,13549	
2349Ca	1	7,875694	92,12431	

Nº amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células VERO Sobrevividas (%)	Cel. VERO Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
	0,5	33,43413	66,56587	-0,19
	0,25	25,90297	74,09703	
	0,125	43,34744	56,65256	
2349Fo	1	0,799075	99,20093	0,7
	0,5	100,8902	-0,89024	
	0,25	112,452	-12,452	
	0,125	107,6953	-7,69526	
2356Rz	1	3,771557	96,22844	0,56
	0,5	45,0619	54,9381	
	0,25	90,53936	9,460639	
	0,125	102,2369	-2,2369	
2372Ca	1	3,896039	96,10396	0,66
	0,5	79,50949	20,49051	
	0,25	99,33987	0,660132	
	0,125	108,0913	-8,09134	
2372Fo	1	3,911127	96,08887	0,63
	0,5	72,68938	27,31062	
	0,25	96,19387	3,806135	
	0,125	99,71709	0,282914	
2372Rz	1	1,625183	98,37482	0,65
	0,5	84,03988	15,96012	
	0,25	93,17989	6,820109	
	0,125	112,4218	-12,4218	
2399Fo	1	2,711572	97,28843	0,66
	0,5	80,00742	19,99258	
	0,25	105,2283	-5,22825	

Nº amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células VERO Sobrevividas (%)	Cel. VERO Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
	0,125	109,7096	-9,70961	
2400Fo	1	2,556913	97,44309	0,7
	0,5	91,38056	8,619441	
	0,25	113,1913	-13,1913	
	0,125	117,3935	-17,3935	
2404Fo	1	1,063127	98,93687	0,68
	0,5	99,55866	0,441342	
	0,25	97,52922	2,470782	
	0,125	100,083	-0,08299	
DMSO	1	0,55011	99,44989	0,61
	0,5	65,00921	34,99079	
	0,25	94,39453	5,605469	
	0,125	113,8477	-13,8477	

Tabela 13 - Inibição dos extratos em células 3T3 e IC₅₀

Nº Amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células Sobrevividas (%)	Células Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
1	1	74,69634	25,30366	1,2
	0,5	84,85751	15,14249	
	0,25	61,61496	38,38504	
	0,125	66,52168	33,47832	
7	1	4,813223	95,18678	0,59
	0,1	94,93223	5,067767	
	0,01	126,5785	-26,5785	
	0,001	111,2926	-11,2926	
8	1	3,315703	96,6843	0,71
	0,5	88,57851	11,42149	
	0,25	126,1884	-26,1884	
	0,125	127,9074	-27,9074	
10	1	55,04793	44,95207	0,98
	0,5	75,13388	24,86612	

Nº Amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células Sobrevividas (%)	Células Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
	0,25	110,4264	-10,4264	
	0,125	128,4033	-28,4033	
13	1	0,499174	99,50083	0,47
	0,5	10,31074	89,68926	
	0,25	93,62314	6,376862	
	0,125	112,3901	-12,3901	
	0,0625	95,39504	4,604959	
	0,03125	113,7851	-13,7851	
	0,015625	98,24463	1,755375	
	0,007813	94,1157	5,884298	
17Fo	1	1,183471	98,81653	0,55
	0,1	76,75372	23,24628	
	0,01	122,8132	-22,8132	
	0,001	126,4364	-26,4364	
17Ra	1	102,2981	-2,29815	0,18
	0,5	73,07921	26,92079	
	0,25	53,17078	46,82922	
	0,125	45,93704	54,06296	
22	1	86,96675	13,03325	7,8
	0,5	114,9367	-14,9367	
	0,25	103,0441	-3,04414	
	0,125	87,8451	12,1549	
23	1	0,510766	99,48923	0,39
	0,5	0,980021	99,01998	
	---	---	---	
	0,125	68,7368	31,2632	
	0,0625	97,81496	2,185045	
	0,03125	97,37218	2,627825	
	0,015625	91,397	8,603004	
	0,078125	90,79298	9,20702	
24	1	1,606612	98,39339	0,53
	0,1	82,81653	17,18347	
	0,01	110,8066	-10,8066	
	0,001	112,1719	-12,1719	
27	1	0,101672	99,89833	0,63
	0,5	69,23614	30,76386	
	0,25	108,9977	-8,99766	
	0,125	102,5845	-2,58451	
35	1	115,9426	-15,9426	-2,5
	0,5	118,2023	-18,2023	
	0,25	100,5944	-0,59439	
	0,125	100,0024	-0,00241	
5/19	1	102,0816	-2,08157	-1,9
	0,5	98,63314	1,366856	
	0,25	87,11113	12,88887	
	0,125	87,62611	12,37389	

Nº Amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células Sobrevividas (%).	Células Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
6/29	1	99,15053	0,84947	-1,2
	0,5	89,96998	10,03002	
	0,25	90,33816	9,661836	
	0,125	74,07548	25,92452	
15/37	1	126,6489	-26,6489	-1,54
	0,5	114,4675	-14,4675	
	0,25	105,1233	-5,1233	
	0,125	99,29491	0,705085	
26/32	1	1,266116	98,73388	0,45
	0,1	33,66281	66,33719	
	0,01	120,6182	-20,6182	
	0,001	110,6545	-10,6545	
2292	1	2,634711	97,36529	0,56
	0,1	106,3273	-6,32727	
	0,01	112,6975	-12,6975	
	0,001	97,00496	2,995041	
2303Fo	1	0,010227	99,98977	0,49
	0,5	3,275759	96,72424	
	0,25	98,96042	1,039578	
	0,125	113,4664	-13,4664	
2303Rz	1	1,153719	98,84628	-10,2
	0,5	0,704132	99,29587	
	0,25	0,747107	99,25289	
	0,125	7,180165	92,81983	
2349Ca	1	44,07927	55,92073	0,8
	---	---	---	
	0,25	72,21049	27,78951	
	0,125	70,51395	29,48605	
2349Fo	1	92,98765	7,012351	2,9
	0,5	111,2621	-11,2621	
	0,25	122,4953	-22,4953	
	0,125	105,8982	-5,89817	
2356Rz	1	0,942149	99,05785	0,47
	0,5	0,595041	99,40496	
	0,25	59,09091	40,90909	
	0,125	142,3074	-42,3074	
2372Ca	1	79,64397	20,35603	1,8
	0,5	112,8528	-12,8528	
	0,25	114,8838	-14,8838	
	0,125	112,357	-12,357	
2372Fo	1	97,19891	2,801088	-6,2
	0,5	109,6041	-9,60408	
	0,25	94,96574	5,034263	
	0,125	90,30928	9,690715	
2372Rz	1	2,899174	97,10083	0,66
	0,5	87,64628	12,35372	

Nº Amostra	Concentração extrato (mg/ml)	Células Sobrevividas (%)	Células Inibidas (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
	0,25	95,30579	4,694214	
	0,125	104,8463	-4,84628	
2399Fo	1	85,54455	14,45545	2,4
	0,5	112,7108	-12,7108	
	0,25	111,8637	-11,8637	
	0,125	109,3105	-9,31049	
2400Fo	1	0,476033	99,52397	0,56
	0,5	26,94876	73,05124	
	0,25	106,3008	-6,30082	
	0,125	116,043	-16,043	
2404Fo	1	106,4204	-6,42037	5,3
	0,5	121,3162	-21,3162	
	0,25	121,0852	-21,0852	
	0,125	116,4961	-16,4961	
DMSO	1	52,84298	47,15702	1,2
	0,5	101,9537	-1,95372	
	0,25	100,5851	-0,58512	
	0,125	91,28264	8,717357	