



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Caracterização fitoquímica e avaliação das propriedades antimicrobianas de plantas usadas na medicina tradicional

Alexandra Teixeira Coimbra

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Ana Paula Coelho Duarte
Coorientador: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira

Covilhã, outubro de 2017

Dedicatória

É com enorme orgulho que dedico este trabalho aos meus queridos pais.

Acredito muito na lei do retorno, tanto para as coisas boas quanto para as ruins. Não há como fugir do que somos e fazemos, um dia as nossas ações dão um jeito de retornar para nós. Vivemos diante de “espelhos”, escolha bem o que você pretende por aí.

- Diego Vinicius

Nunca, em hipótese alguma, se culpe por aquilo que não dependia só de você.

- Autor desconhecido

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação de Ciências da Saúde por terem disponibilizado as condições necessárias para a realização deste trabalho e a oportunidade de fazer parte desta família.

À Prof^a Doutora Ana Paula Duarte e à Doutora Susana Ferreira, as minhas orientadoras nesta dissertação, pelo conhecimento que me transmitiram, por toda a disponibilidade e simpatia, pelo rigor científico, pelo apoio e atenção e por toda a ajuda na realização do trabalho laboratorial, foram absolutamente incansáveis.

Agradeço também a todos os membros do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, principalmente a todos os colegas dos diversos laboratórios onde trabalhei, por toda a entreatajuda demonstrada, pela boa disposição, pelo bom ambiente de trabalho proporcionado na realização da parte experimental deste trabalho. Assim como, às técnicas de laboratório e professores que me ajudaram sempre que necessitei.

Às minhas colegas de casa por todo o apoio que me deram, por todos os risos, por todas as brincadeiras, por todos os jantares, por todos os choros! Vocês são sem dúvida as pessoas que melhor me conhecem e agradeço-vos bastante por isso!! E claro que a Catarina, que apesar de ser muito rabugenta e ter um humor negro, fez por mim o que pouca gente faria. Tem, por isso, direito um chocolate, uma ida ao sushi e uma garrafa de licor. Adoro-vos do fundo do meu coração.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta fase da minha vida, pela amizade, carinho e incentivo constante que muito contribuiu para a conclusão deste trabalho.

Um especial agradecimento aquela menina dos laços que por mais chata que fosse e por muitos “sermões” que eu lhe dei (que sempre tive razão e sempre foi para o teu bem!! :D), esteve constantemente presente e sempre me ajudou quando eu precisei. Vais ficar sempre marcada no meu coração.

Aos meus amigos, na minha querida terra, principalmente ao pessoal do “Bimbo’s House” que mais uma vez nunca me deixaram triste e sempre me alegraram quando eu mais precisei, mesmo que fosse com conversas estúpidas e impróprias, mas que acabavam sempre com todos a rir à gargalhada.

Finalmente agradeço à minha família por terem estado sempre presentes, mesmo que estivessem um pouco mais longe, por me apoiarem em todas as etapas da minha vida e por se preocuparem constantemente comigo.

Finalmente, gostaria de agradecer aos meus pais, que nunca se importaram com o que eu fizesse da minha vida, desde que estivesse feliz. Após a passagem por diversas

dificuldades, principalmente a nível pessoal, estiveram sempre presentes, acreditarem nas minhas capacidades e apoiaram em tudo o que podiam. Sem vocês, nada disto seria possível. Muito obrigada por todo o amor e por fazerem com que eu alcançasse os meus objetivos! Amo-vos muito!

A todos,

Muito obrigada.

Resumo

Os produtos naturais têm uma grande importância no tratamento de doenças desde os tempos antigos. De fato, na medicina tradicional, as plantas desempenham um papel crucial na prevenção de diferentes doenças e receberam especial atenção para novas opções terapêuticas. Neste contexto, a descoberta de novos agentes antimicrobianos é uma necessidade urgente para combater infecções oportunistas ou a resistência dos microrganismos aos antibióticos. Os produtos naturais alternativos encontrados nas plantas podem ter interesse, pois alguns extratos vegetais com os seus fitoquímicos são conhecidos por terem propriedades antimicrobianas, o que pode ter uma grande importância na terapêutica.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de duas plantas utilizadas na medicina tradicional, mais especificamente o medronheiro e o pirliteiro. Para este fim, estudou-se a composição química das folhas desses dois arbustos, bem como suas propriedades biológicas.

O *Arbutus unedo* (medronheiro) pertence à família *Ericaceae* e na medicina tradicional tem sido utilizado como antisséptico, diurético, laxante e para tratar a hipertensão arterial. O *Crataegus monogyna* (pirliteiro) é uma espécie da família *Rosaceae* e vários estudos demonstraram que consegue reduzir alguns fatores de risco cardiovasculares e tem sido utilizado para o tratamento de algumas doenças, incluindo irritabilidade, insônia, confusão e perda de memória.

As folhas destas plantas foram extraídas com metanol e o extrato metanólico foi separado em frações usando solventes de polaridade crescente (N-hexano, éter dietílico e água). A caracterização fitoquímica dos extratos foi realizada utilizando métodos espectrofotométricos. O conteúdo fenólico total das amostras foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e os flavonoides foram determinados com um método que usa o cloreto de alumínio. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH e pelo método que usa o sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os extratos brutos e as suas respectivas frações obtidas no processo de separação foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana contra várias bactérias gram positivas e gram negativas e também leveduras.

Os resultados indicaram que o medronheiro possui uma quantidade maior de compostos fenólicos ($202,53 \pm 5,82$ mg GAE / g de extrato) do que o pirliteiro ($110,41 \pm 1,47$ mg GAE / g de extrato). Por outro lado, o pirliteiro apresentou maior teor em flavonoides ($29,94 \pm 1,85$ mg QE / g de extrato e $26,85 \pm 1,12$ mg QE / g de extrato, para medronheiro e pirliteiro, respetivamente). Quanto à atividade de eliminação radicalar, a planta com maior potencial (IC_{50} inferior) foi o medronheiro, $17,41 \pm 4,50$ μ g / mL contra $36,11 \pm 2,11$ μ g / mL

para o pirliteiro. Em comparação com os padrões utilizados na determinação da atividade antioxidante, ambas as plantas possuem atividade antioxidante, mas inferior aos padrões.

Em relação à atividade antimicrobiana, os extratos e as frações de medronheiro possuem propriedades antimicrobianas contra algumas bactérias, mas com os valores obtidos para a concentração mínima inibitória indicando que estes não possuem relevância terapêutica. No que diz respeito às leveduras, a maioria dos extratos e frações inibiu o crescimento das espécies *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*. Os valores mais baixos de concentração mínima inibitória obtidos foram 0,063 mg/mL na fração apolar do extrato de pirliteiro em *C. tropicalis* e 0,008 mg/mL no extrato bruto e nas frações mais polares do extrato de medronheiro em *C. lusitaniae*. Por análise do potencial sinérgico dos extratos e frações mais relevantes com a Anfotericina B, verificou-se que existe um efeito aditivo ou sinérgico dos extratos com este antifúngico.

Em suma, estas duas plantas possuem atividade antioxidante e atividade antimicrobiana relevante contra leveduras, com potencial interação sinérgica com a Anfotericina B. Estes resultados são promissores para um possível uso dos seus extratos, ou apresentando-se como agentes com potencialidade no desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave

Medronheiro, pirliteiro, compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana

Abstract

Since ancient times, natural products have a significant importance in disease treatment. In fact, in traditional medicine, plants play a crucial role in the prevention of different diseases and have received considerable attention for novel therapeutic options. In this context, the discovery of new antimicrobial agents to fight opportunistic infections or antibiotic microbial resistance is an urgent need. Alternative natural products from plants could be of interest because some plant extracts with their phytochemicals are known to have antimicrobial properties, which could be of great importance in therapeutic. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of two plants used in traditional medicine, more specifically strawberry tree and hawthorn. For this purpose, the chemical composition of the leaves of these two shrubs, as well as, their biological properties were studied.

Arbutus unedo (strawberry tree) belongs to *Ericaceae* family and in traditional folk medicine has been used in antiseptics, diuretics, laxatives and to treat arterial hypertension. *Crataegus monogyna* (hawthorn) is a species of the *Rosaceae* family and several studies have shown that it could reduce some cardiovascular risk factors and been used to the treatment of some diseases including irritability, insomnia, confusion and memory loss.

The leaves of these plants were extracted with methanol and the methanolic extract was separated into fractions using solvents of increasing polarity (N-hexane, diethyl ether and water). The phytochemical characterization of the extracts was performed using spectrophotometric methods. The total phenolic content in samples was determined using the Folin-Ciocalteu's method and flavonoids were determined by a method using aluminum chloride. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH method and through the use of β -carotene/linoleic acid system. The crude extracts and their fractions obtained in the separation process were tested for their antimicrobial activity against several gram positive and gram negative bacteria and also yeasts.

The results indicated that strawberry tree has a greater amount of phenolic components ($202,53 \pm 5,82$ mg GAE/ g of extract) than the hawthorn ($110,41 \pm 1,47$ mg GAE/ g of extract). On the other hand, the hawthorn had a higher content of flavonoids ($29,94 \pm 1,85$ mg QE/ g of extract and $26,85 \pm 1,12$ mg QE/ g of extract for strawberry tree and hawthorn, respectively). Regarding radical scavenging activity, the plant with most potential (lower IC_{50}), was strawberry tree, $17,41 \pm 4,50$ μ g/mL against $36,11 \pm 2,11$ μ g/mL for hawthorn. Compared with the standards used in the determination of the antioxidant activity, both plants have antioxidant activity but lower than the standards.

Concerning to the antimicrobial activity, extracts and fractions of strawberry tree showed antimicrobial properties against some of the tested bacteria, but with the obtained minimum inhibitory concentration values indicating that these have no therapeutic relevance.

Regarding yeasts, most of the extracts and fractions inhibited the growth of strain *C. tropicalis* and *C. lusitaniae*. The lowest values of minimum inhibitory concentration were 0,063 mg/mL in apolar fraction of hawthorn extract of *C. tropicalis* and 0,008 mg/mL in the crude extract and in the more polar fractions of strawberry tree extract in *C. lusitaniae*. By analyzing the synergistic potential of the most relevant extracts and fractions with Amphotericin B, it was verified that there was an additive or synergistic effect of the extracts with the antifungal.

In sum, these two plants have antioxidant activity and relevant antimicrobial activity against yeasts. These results are promising for the possible use of these extracts, or for the pharmaceutical development of new drugs.

Keywords

Strawberry tree, hawthorn, phenolic content, antioxidant activity, antimicrobial activity

Índice

Capítulo 1. Introdução	1
1.1 Compostos bioativos.....	1
1.2 Atividade Antioxidante.....	4
1.3 Atividade Antimicrobiana.....	6
1.4 <i>Arbutus unedo</i>	8
1.4.1 Compostos presentes no medronheiro	9
1.4.2 Utilização na medicina tradicional e atividade biológica	13
1.5 <i>Crataegus monogyna</i>	14
1.5.1 Compostos presentes no pirliteiro.....	15
1.5.2 Utilização na medicina tradicional e atividade biológica	16
Capítulo 2. Objetivos.....	19
Capítulo 3. Materiais e Métodos.....	20
3.1 Extração das folhas das plantas	20
3.1.1 Preparação dos extratos	20
3.2 Determinação dos Fenóis totais	20
3.3 Determinação dos Flavonoides	21
3.4 Determinação da Atividade Antioxidante.....	22
3.4.1 Método do DPPH	22
3.4.2 Método que usa o sistema β -caroteno/ácido linoleico	26
3.5 Separação dos extratos metanólicos em frações.....	26
3.6 Cromatografia em Camada Fina (TLC)	27
3.7 Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	28
3.7.1 Microrganismos e extratos	28
3.7.2 Conservação dos microrganismos e dos meios de cultura	28
3.7.3 Suscetibilidade bacteriana dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro por ensaios de difusão em disco	29
3.7.4 Suscetibilidade fúngica dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro por ensaios de difusão em disco	29
3.7.5 Suscetibilidade bacteriana dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respectivas frações por ensaios de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)..	30

3.7.6 Suscetibilidade de leveduras aos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respectivas frações por ensaios determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)..	31
3.7.7 Bioautografia	31
3.7.8 Estudo do efeito combinado dos extratos com o antifúngico Anfotericina B	32
3.8 Análise estatística	33
Capítulo 4. Resultados e Discussão	34
4.1 Extração das plantas	34
4.2 Determinação dos Fenóis totais	34
4.3 Determinação dos Flavonoides	36
4.4 Determinação da Atividade antioxidante	37
4.4.1 Método do DPPH	37
4.4.2 Método do sistema β -caroteno/ácido linoleico	39
4.5 Separação dos extratos metanólicos em frações	41
4.6 Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	46
4.6.1 Suscetibilidade bacteriana e fúngica dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro por ensaios de difusão em disco	46
4.6.2 Suscetibilidade bacteriana dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respectivas frações por ensaios determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)..	48
4.6.3 Suscetibilidade de leveduras aos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respectivas frações por ensaios determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)..	50
4.6.4 Bioautografia	52
4.6.5 Estudo do efeito combinado dos extratos com o antifúngico Anfotericina B	55
Capítulo 5. Conclusão	58
Capítulo 6. Referências Bibliográficas	60
Anexo I.....	69
Determinação da Atividade antioxidante (Método do DPPH)	69
Extrato de pirliteiro	69
Padrão Rutina	71
Padrão Trolox	72
Padrão Ácido gálico	74
Anexo II: Comunicação oral	77

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química do composto fenólico ácido trigaloilquinico (Adaptado de Miguel et al. 2014).	2
Figura 2: Estrutura química das subclasses dos flavonoides (Adaptado de Del Rio et al. 2013). 3	
Figura 3: Folhas, flores e frutos do medronheiro. (Fonte: https://www.gardeningexpress.co.uk/arbutus-unedo-strawberry-tree/)	9
Figura 4: Estrutura química dos flavonóis que se encontram nas folhas do medronheiro (Adaptado de Zhang et al. 2001).	10
Figura 5: Estrutura química das antocianinas presentes no medronheiro (Adaptado de Oliveira et al. 2011).	10
Figura 6: Estrutura química das proantocianidinas e antocianidinas mais comuns no medronheiro (Adaptado de Oliveira et al. 2011).	11
Figura 7: Estrutura química de alguns carotenóides e vitamina E presentes no medronheiro (Adaptado de Miguel et al. 2014).	11
Figura 8: Estrutura química de alguns triterpenos e ácidos orgânicos presentes no medronheiro (Adaptado de Miguel et al. 2014).	12
Figura 9A e 9B: Folhas, frutos e flores do pirliteiro. (Fonte: A - http://www.ewburrownursery.co.uk/crataegus-monogyna-hawthorn-1139.html ; B - http://www.brickfieldspark.org/data/hawthorn.htm)	15
Figura 10: Estrutura química das principais classes dos flavonóides que se encontram no pirliteiro (Adaptado de Nabavi et al. 2015).	15
Figura 11: Estrutura química de triterpenos encontrados nas folhas e flores do pirliteiro (Adaptado de Nabavi et al. 2015).	16
Figura 12: Curva de calibração dos fenóis totais usando o ácido gálico como referência.	21
Figura 13: Curva de calibração dos flavonoides usando a quercetina como referência.	22

Figura 14: Curva de calibração das soluções metanólicas de DPPH.	23
Figura 15: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no extrato de medronheiro.	24
Figura 16: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no extrato de medronheiro.	24
Figura 17: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no extrato de medronheiro.	25
Figura 18: Teor de fenóis totais presentes em cada um dos extratos brutos metanólicos das plantas (média de três determinações \pm desvio padrão).	35
Figura 19: Teor de flavonoides presentes em cada um dos extratos brutos metanólicos das plantas (média de três determinações \pm desvio padrão).	36
Figura 20: Índice da atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos e dos padrões. (Média de três determinações \pm desvio médio).	38
Figura 21: Atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos e do padrão BHT.	40
Figura 22: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 1:1 e no cromatograma do lado direito usou-se acetato de etilo/metanol 1:1.	42
Figura 23: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 1:1 e no cromatograma do lado direito usou-se acetato de etilo/metanol 1:1.	42
Figura 24: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2.	43
Figura 25: Cromatogramas do extrato e respectivas frações do pirliteiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2.	43

- Figura 26: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de DPPH. 44
- Figura 27: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de DPPH 44
- Figura 28: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de Reagente de Folin-Ciocalteu..... 45
- Figura 29: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro. . No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de Reagente de Folin-Ciocalteu..... 45
- Figura 30: Bioautografia da anfotericina B (esquerda), do extrato bruto metanólico e respectivas frações do medronheiro (centro) e do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro (direita) para a espécie *Candida albicans* ATCC 90028. 53
- Figura 31: Bioautografia da anfotericina B (esquerda), do extrato bruto metanólico e respectivas frações do medronheiro (centro) e do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro (direita) para a espécie *Candida tropicalis* ATCC 750..... 53
- Figura 32: Bioautografia da anfotericina B (esquerda), do extrato bruto metanólico e respectivas frações do medronheiro (centro) e do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro (direita) para a espécie *Candida lusitaniae*..... 54
- Figura 33: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no extrato de pirliteiro. 69
- Figura 34: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no extrato de pirliteiro. 69
- Figura 35: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no extrato de pirliteiro. 70

Figura 36: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no padrão rutina. ..	71
Figura 37: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no padrão rutina. ..	71
Figura 38: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no padrão rutina. ..	71
Figura 39: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no padrão trolox. ..	72
Figura 40: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no padrão trolox. ..	73
Figura 41: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no padrão trolox. ..	73
Figura 42: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no padrão ácido gálico.....	74
Figura 43: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no padrão ácido gálico.....	75
Figura 44: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no padrão ácido gálico.....	75

Índice de Tabelas

Tabela 1: Concentrações das soluções metanólicas de DPPH para a curva de calibração.	23
Tabela 2: Valor obtido de IC ₅₀ para o extrato de medronheiro através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.	25
Tabela 3: Massas totais obtidas para cada fração do medronheiro e do pirliteiro.	27
Tabela 4: Valores de IC ₅₀ , índice da atividade antioxidante e atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos e dos respectivos padrões. (Média de três determinações ± desvio médio).	38
Tabela 5: Diâmetros dos halos de inibição dos extratos metanólicos em espécies de bactérias e de leveduras apresentados como média ± desvio padrão. Usaram-se discos com o diâmetro de 6 mm.	47
Tabela 6: Concentração mínima inibitória dos extratos metanólicos brutos e respectivas frações para as bactérias em estudo.	49
Tabela 7: Concentração mínima inibitória dos extratos metanólicos brutos e das respectivas frações para leveduras.	51
Tabela 8: Valores obtidos para o Índice de concentração inibitória fracionada e o respectivo efeito dos extratos de medronheiro juntamente com o antifúngico Anfotericina B.	56
Tabela 9: Valores obtidos para o Índice de concentração inibitória fracionada e o respectivo efeito dos extratos de pirliteiro juntamente com o antifúngico Anfotericina B.	56
Tabela 10: Valor obtido de IC ₅₀ para o extrato de pirliteiro através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.	70
Tabela 11: Valor obtido de IC ₅₀ para o padrão rutina através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.	72
Tabela 12: Valor obtido de IC ₅₀ para o padrão trolox através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.	74
Tabela 13: Valor obtido de IC ₅₀ para o padrão ácido gálico através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.	76

Lista de Acrónimos

AAI	Índice da atividade antioxidante, do inglês <i>Antioxidant Activity Index</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain heart infusion
BHIA	Brain heart infusion Agar
BHT	hidroxitolueno butilado, do inglês <i>butylated hydroxytoluene</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil, do inglês <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
F1M	Fração do N-hexano do medronheiro
F1P	Fração do N-hexano do pirliteiro
F2M	Fração do éter dietílico do medronheiro
F2P	Fração do éter dietílico do pirliteiro
F3M	Fração da água do medronheiro
F3P	Fração da água do pirliteiro
F4M	Fração não solúvel do medronheiro
F4P	Fração não solúvel do pirliteiro
FIC	Concentração inibitória fracionada, do inglês <i>fractional inhibitory concentration</i>
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada, do inglês <i>fractional inhibitory concentration index</i>
GAE	Equivalentes de ácido gálico, do inglês <i>gallic acid equivalents</i>
GSH	Glutathiona
MDA	Dialdeído malónico, do inglês <i>malondialdehyde</i>
MHA	Müller-Hinton Agar
MHB	Caldo Müller-Hinton, do inglês <i>Müller-Hinton Broth</i>
MTT	Brometo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
QE	Equivalentes de quercetina, do inglês <i>quercetin equivalents</i>
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
SDA	Sabourad Dextrose Agar
TLC	Cromatografia em camada fina, do inglês <i>thin-layer chromatography</i>
UFC	Unidades formadoras de colónias

Capítulo 1. Introdução

No passado, as plantas eram usadas pelas pessoas sem que estas tivessem conhecimento sobre as suas propriedades bioativas. As plantas eram usadas para fins nutricionais, mas após a descoberta das propriedades medicinais, essa flora natural passou a ser uma fonte útil de tratamentos e melhoria da saúde das várias comunidades humanas (Azmir *et al.* 2013). Na medicina tradicional, as plantas e as formulações preparadas a partir destas desempenharam um papel crucial na prevenção e atenuação de diferentes doenças (Nabavi *et al.* 2015).

No meio ambiente, as plantas são frequentemente expostas a diferentes fatores de stress e a condições ambientais desfavoráveis. Para garantir a sua sobrevivência, desenvolveram defesas químicas e sintetizando uma quantidade importante e variável de metabolitos secundários que participam em vários mecanismos de proteção. Este fenómeno consiste numa adaptação da planta ao ecossistema que pode estar relacionado com a concorrência com outras plantas pela disponibilidade de nutrientes do solo, devido a secas ou alterações climáticas, com a infestação por moluscos ou insetos, com a quantidade de luz solar acessível, com doenças e outros fatores. O resultado desses mecanismos adaptativos, fez com que uma ampla gama de compostos protetores com propriedades bioativas (antioxidante e antimicrobiana, entre outras), fossem acumulados em plantas e frutas (Mosele *et al.* 2016b). Os diferentes compostos bioativos presentes no reino vegetal são responsáveis pelos efeitos farmacológicos das plantas medicinais (Nabavi *et al.* 2015).

Pelo exposto, plantas despertaram o interesse de cientistas de todo o mundo devido ao baixo custo, disponibilidade e efeitos colaterais leves ou reversíveis (Elango *et al.* 2009) e durante as últimas duas décadas, os medicamentos à base de plantas receberam especial atenção como opções terapêuticas alternativas ou complementares para tratamentos de diferentes doenças (Nabavi *et al.* 2015).

1.1 Compostos bioativos

Os compostos presentes no sistema biológico das plantas podem ser divididos em dois grandes grupos, os metabolitos primários que são substâncias químicas destinadas ao crescimento e ao desenvolvimento da planta, como hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas e lípidos. Um segundo grupo é constituído pelos metabolitos secundários, os quais são geralmente produzidos numa fase posterior ao crescimento, não tendo função no

crescimento, mas são um grupo de compostos que ajudam a planta a aumentar a sua capacidade de sobrevivência e a superar condições adversas locais. Entre os metabolitos secundários encontramos substâncias com efeitos bioativos em sistemas biológicos. Os compostos bioativos de plantas podem ser identificados e caracterizados a partir de várias partes da planta, como folhas, caule, flor e frutas (Azmir *et al.* 2013).

Entre os metabolitos secundários, encontram-se os compostos fenólicos que possuem um anel aromático que pode conter um ou mais grupos hidroxilo e assim podem variar entre uma molécula fenólica simples (C_6) ou uma molécula mais complexa (Figura 1) (Chen *et al.* 2015). A fruta, os vegetais e certas bebidas, como chá, café, vinho e sumos de fruta, são as principais fontes de compostos fenólicos da dieta humana (Hinojosa-Nogueira *et al.* 2017). Os compostos fenólicos estão associados a diversas propriedades fisiológicas, incluindo atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e são considerados os antioxidantes naturais mais importantes nas plantas e em alimentos derivados de plantas (Chen *et al.* 2015).



Figura 1: Estrutura química do composto fenólico ácido trigaloilquinico (Adaptado de Miguel *et al.* 2014).

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos e encontram-se bastante distribuídos em frutos, vegetais e cereais. A diferença na estrutura do anel heterocíclico que possui faz com que possam ser divididos em subclasses (Figura 2), como flavonas, flavonóis, flavanóis (flavan-3-ol), flavononas, antocianidinas e isoflavonas. Apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e atividade protetora contra certas doenças crônicas, como cancro, diabetes e doença cardíaca coronária (Magalhães *et al.* 2012).

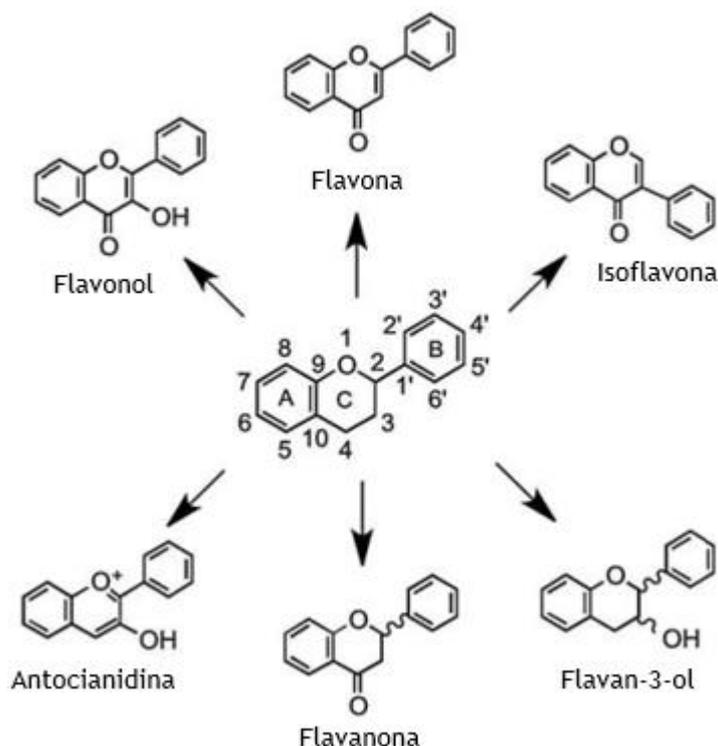


Figura 2: Estrutura química das subclasses dos flavonoides (Adaptado de Del Rio *et al.* 2013).

Os fenóis totais em geral e os flavonoides em particular são dos compostos presentes em plantas que são mais estudados, pois são responsáveis pela eliminação de radicais livres e contribuem assim para a atividade antioxidante das plantas (Denni *et al.* 2012).

O estudo e caracterização destes compostos passa pela sua extração das plantas, sendo que a eficiência deste processo depende principalmente da escolha do solvente e a polaridade do composto alvo é o fator mais importante para facilitar essa escolha. A afinidade molecular entre solvente e soluto, a transferência de massa e o uso de co-solvente também são fatores a considerar para a seleção do solvente (Azmir *et al.* 2013).

Os métodos analíticos utilizados para a determinação de compostos fenólicos em produtos alimentares podem ser divididos em ensaios separativos e não separativos. Embora as técnicas cromatográficas forneçam informações qualitativas e quantitativas dos fenóis, estas metodologias requerem equipamentos muito sofisticados, operadores qualificados e demoram tempo para a sua análise. Além disso, a elevada diversidade química e a limitada disponibilidade de padrões analíticos individuais, tornam as técnicas separativas de difícil viabilidade para a determinação de compostos fenóis em geral e flavonoides em particular. (Magalhães *et al.* 2012).

Os compostos fenólicos podem ser determinados por diversos métodos, mas o mais usado é o Método de Folin-Ciocalteu (Hinojosa-Nogueira *et al.* 2017). A precisão dos resultados obtidos a partir deste método é confirmada pelos padrões usados, pela ordem em que os reagentes são adicionados e pelo reagente Folin-Ciocalteu que contém molibdênio e

ácido túngstico. Este método é um método colorimétrico, uma vez que a determinação de compostos fenólicos é verificada pela redução do molibdénio de Mo^{6+} (de cor amarelo) para Mo^{5+} (de cor azul). A presença de carbonato de sódio neste método é essencial para se obter um meio alcalino permitindo assim a quantificação dos fenóis (Chen *et al.* 2015). A quantidade de fenóis totais na amostra é calculada a partir da curva de calibração obtida para o padrão (ácido Gálico) e os resultados são apresentados em equivalentes de ácido Gálico por grama de extrato (Luís *et al.* 2014). Este método, porém, tem algumas desvantagens dado que é um método não específico para compostos fenólicos, podendo ocorrer falsos positivos devido à presença de moléculas redutoras não-fenólicas. Estas substâncias interferentes podem ser açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, ácidos orgânicos entre outros, e podem reagir com o Reagente de Folin-Ciocalteu (Chen *et al.* 2015).

No que respeita aos flavonoides presentes nos extratos, estes podem ser determinados com um método colorimétrico que usa cloreto de alumínio. O uso de cloreto de alumínio permite o desenvolvimento de complexos de cor amarelo intenso na presença de flavonoides. A presença de acetato de potássio permite a quantificação de mais subclasses de flavonoides uma vez que, o cloreto de alumínio tem apenas especificidade para flavonas e flavonóis. Assim, consegue-se quantificar os flavonoides através de medições espectrofotométricas e comparando com o padrão Quercetina (Denni *et al.* 2012). A quantidade de flavonoides na amostra é calculada a partir da curva de calibração obtida para o padrão e os resultados são apresentados em equivalentes de quercetina por grama de extrato (Luís *et al.* 2014). Este método é rápido e barato e reduz a necessidade de padrões analíticos individuais para a determinação de flavonoides (Denni *et al.* 2012).

1.2 Atividade Antioxidante

Muitas doenças estão associadas ao envelhecimento da população, tais como a diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e o cancro. Um dos fatores que influencia estas doenças é o stress oxidativo que as células possam sofrer, ou seja, é o desequilíbrio entre a capacidade que as células têm de neutralizar os efeitos provocados pelas espécies radicais de oxigénio ou azoto e a produção destas. O desequilíbrio no balanço biológico pode provocar modificações em biomoléculas como o DNA, proteínas e lípidos, levando a alterações nas células associadas ao desenvolvimento destas patologias (Jardim *et al.* 2017).

Associado ao stress oxidativo estão as espécies reativas de oxigénio, como os radicais de aniões superóxido (O_2^-), o radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), espécies de radicais não livres como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o singlete de oxigénio ($^1\text{O}_2$) (Oliveira *et al.* 2009). Quando o

anião superóxido reage com o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) forma a espécie reativa de azoto, peroxinitrito (ONOO^-) (Huang *et al.* 2005). Os compostos antioxidantes são definidos como aqueles que a baixas concentrações são capazes de prevenir danos oxidativos mediados por radicais livres, eliminando diretamente as espécies radicais, modulando a atividade enzimática ou quelando íons metálicos (Abuashwashi *et al.* 2016).

Um dos métodos *in vitro* mais usado para avaliar a atividade antioxidante de extratos provenientes de plantas baseia-se na eliminação de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) na presença de antioxidantes nos extratos testados. O DPPH é um radical livre que possui um eletrão de valência não emparelhado e a eliminação deste radical é a base do método (Sharma *et al.* 2009). O radical DPPH é estável, mas sensível à luz, oxigénio, pH e ao tipo de solvente usado (Scherer *et al.* 2009). Quando o radical DPPH (de cor de violeta escuro) reage com compostos antioxidantes, estes doam hidrogénio e o DPPH fica reduzido (difenilpicril-hidrazina de cor amarelo claro). As mudanças de cor podem ser acompanhadas através da medição espectrofotométrica com luz UV/Visível (Miliauskas *et al.* 2004). A diminuição da absorção da solução de DPPH na presença de extratos e soluções padrão, é monitorizada a 517 nm (Luís *et al.* 2017). A redução da absorção de DPPH é indicativa da capacidade dos extratos para eliminar os radicais livres, independentemente de qualquer atividade enzimática (Tadić *et al.* 2008).

Outro método também usado na caracterização da atividade antioxidante é o ensaio do β -caroteno, que avalia a atividade antioxidante a partir da descoloração do β -caroteno, de cor amarelada, depois da reação deste com um radical livre. Isto acontece devido à junção de um radical livre linoleato ou radical peróxido lipídico a uma ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ do β -caroteno. Os antioxidantes que estiverem presentes previnem a degradação do β -caroteno, mantendo assim a sua cor característica, uma vez que vão competir, com o β -caroteno, pelos radicais livres (Ueno *et al.* 2014). Este método baseia-se na reação de transferência de átomos de hidrogénio (Dawidowicz *et al.* 2015).

O aumento do interesse em produtos naturais incentivou a comunidade científica a procurar antioxidantes naturais provenientes de plantas e a investigar a sua importância na medicina, nutrição humana e indústria de alimentos. Foi demonstrado que, além dos compostos fenólicos, as plantas possuem outros compostos antioxidantes naturais como os carotenoides e vitaminas, entre outros (Oliveira *et al.* 2009). Os fenóis podem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio, eliminadores de radicais superóxido e quelantes de metais e quando os radicais livres se formam, estes compostos antioxidantes vão eliminá-los (Guimarães *et al.* 2014).

A falta de soluções terapêuticas para distúrbios degenerativos levou ao aumento de interesse sobre novos compostos e bio-produtos com efeitos favoráveis à saúde. Os compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos, têm recebido especial atenção na prevenção e diminuição da oxidação. Estudos epidemiológicos, pré-clínicos e clínicos mostraram a

importância desses compostos naturais para a saúde humana e os mecanismos que podem estar associados à proteção conferida pelos fenóis. Podendo ocorrer inibição da proliferação celular e alteração das vias de transdução de sinal (Jardim *et al.* 2017).

Uma das plantas estudadas neste trabalho foi o medronheiro e, segundo a literatura, a quantidade de fenóis totais e a atividade antioxidante das folhas sugerem que os compostos fenólicos podem ser os principais contribuintes para as propriedades antioxidantes das folhas desta planta (Nenadis *et al.* 2015). O pirliteiro foi a outra planta avaliada neste estudo, sendo que os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides e os ácidos fenólicos, presentes nos extratos metanólicos desta planta estão associados à atividade antioxidante para eliminar os radicais. A combinação dos flavonoides e ácidos fenólicos pode aumentar sinergicamente o efeito antioxidante destes extratos (Abuashwashi *et al.* 2016).

1.3 Atividade Antimicrobiana

Os microrganismos adaptam-se rapidamente às mudanças no seu ambiente e ajustam adequadamente a atividade celular e a expressão genética podendo gerar variantes que estão melhor adaptadas a condições adversas persistindo por períodos mais longos (Morschhäuser 2016). Os microrganismos podem expressar fatores de virulência como toxinas (Otto 2014) e proteínas de membrana (Foster *et al.* 2013) que são essenciais para a colonização e a sobrevivência no hospedeiro. Adaptam-se a condições ambientais adversas como por exemplo elevadas temperaturas (Li *et al.* 2016) e a alterações de pH (Fàbrega *et al.* 2014), podem desenvolver biofilmes (Ali *et al.* 2017; Moradali *et al.* 2017) que desempenham um papel de proteção e muitos mais mecanismos de sobrevivência. Essas variantes podem surgir e expandir-se dentro de uma população em períodos de tempo relativamente curtos e sob pressão seletiva (Morschhäuser 2016).

Um exemplo bem conhecido desta microevolução é o desenvolvimento da resistência a fármacos em microrganismos patogênicos durante a terapia antimicrobiana (Morschhäuser 2016). As infecções bacterianas resistentes ao tratamento antibiótico são dos principais fatores que ameaçam a saúde dos seres humanos e mais de 70% dos patógenos nosocomiais tornaram-se resistentes às drogas usadas em tratamentos de primeira linha (Soltani *et al.* 2017). A aplicação extrema de antibióticos nos últimos anos fez com que as bactérias desenvolvessem resistência a este tipo de fármacos, sendo que as estirpes multirresistentes aos antibióticos são atualmente o maior problema na cura de infecções (Behbahani *et al.* 2017). Do mesmo modo, o uso profilático e tratamentos de longo prazo com vários fármacos antifúngicos levaram ao aumento da prevalência de resistência a fármacos em fungos, tornando-se uma questão importante em várias infecções fúngicas (Yang *et al.* 2008).

Muitas estirpes de diferentes bactérias desenvolvem resistência a desinfetantes, a antibióticos e ao stress ambiental. Por exemplo, existem estirpes de *Staphylococcus aureus* que são resistentes à meticilina (Foster *et al.* 2013), estirpes de *Listeria monocytogenes* resistentes a desinfetantes que sejam constituídos por amónio (Buchanan *et al.* 2017), certas estirpes de *Escherichia coli* podem resistir ao calor (Li *et al.* 2016) e estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* que desenvolveram resistência contra quase todas as classes de antibióticos de uso comum (Moradali *et al.* 2017). Mas também as leveduras desenvolvem resistências, como é o caso de certas estirpes de *Candida albicans* (Morschhäuser 2017) e de *Candida tropicalis* (Kothavade *et al.* 2010) que podem ser resistentes ao antifúngico fluconazol, algumas estirpes de *Candida glabrata* são resistentes às equinocandinas e ao fluconazol (Wiederhold 2016) e há estirpes de *Candida lusitanae* que têm surgido como resistentes à anfotericina B (Asner *et al.* 2015).

A crescente taxa de resistência dos agentes patogénicos aos antibióticos apresenta uma grande ameaça para a saúde pública, sendo considerada um grave problema de saúde a nível global pela Organização Mundial de Saúde (Malheiro *et al.* 2012), devido à redução da eficácia do tratamento antibiótico que por sua vez pode levar a um aumento da morbidade e mortalidade humana (Luís *et al.* 2014). A descoberta de novos agentes antimicrobianos é então uma necessidade urgente, tanto para o combate a infeções oportunistas associadas a indivíduos imunocomprometidos como para o tratamento de infeções associadas a microrganismos resistentes a múltiplos fármacos (Malheiro *et al.* 2012).

No cenário atual de resistência múltipla aos antibióticos, a procura de novas substâncias antimicrobianas a partir de outras fontes, como as plantas, tem recebido grande atenção (Luís *et al.* 2014). Os produtos naturais de origem em plantas podem ser de interesse, dado que algumas plantas e fitoquímicos são reconhecidos por terem propriedades antimicrobianas, e vários estudos realizados, em diferentes países, com aplicação de extratos de plantas, têm demonstrado a eficácia em ensaios *in vitro* (Coutinho *et al.* 2008). No entanto, o desenvolvimento de novos antimicrobianos tem um atraso em relação ao rápido aparecimento da resistência a antibióticos existentes. Na ausência de novos produtos farmacêuticos potentes, os agentes patogénicos multirresistentes são frequentemente tratados com combinações de dois ou mais antibióticos. A terapia combinada oferece uma alternativa para o surgimento de resistência aos fármacos já que os microrganismos patogénicos são menos propensos de desenvolver mutações que os tornam resistentes pela aplicação de antibióticos múltiplos, não obstante as resistências podem ainda assim surgir. As interações entre antibióticos múltiplos podem resultar num comportamento sinérgico ou antagonista, em que a combinação mostra eficiência melhorada ou diminuída em comparação a cada antibiótico aplicado individualmente (Mohan *et al.* 2013). Assim, a crescente necessidade de novas moléculas e tratamentos abriu portas para a investigação da combinação de extratos de plantas com os antibióticos de modo a que o efeito destes seja potenciado (Sassi *et al.* 2007). Por exemplo, sabendo que a prevenção de infeções em

ambientes de cuidados de saúde é essencial e a desinfecção tem que ser eficaz, e que por sua vez também neste caso, o uso exagerado ou não controlado de desinfetantes e antissépticos acelera o processo de desenvolvimento de mecanismos de resistência, o conceito de combinação destes produtos com óleos essenciais de plantas foi já avaliado. O gluconato de clorhexidina é um antisséptico com amplo espectro de ação, que é muito comumente usado como antisséptico da pele principalmente em zonas hospitalares de cuidados intensivos, ajudando na prevenção da colonização de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, podendo no entanto, por vezes não ser muito eficaz. Assim, foi estudado um possível efeito sinérgico entre o gluconato de clorhexidina e ingredientes naturais como os óleos essenciais de plantas com o objetivo de comparar a eficiência antimicrobiana do óleo essencial sozinho ou em combinação com o antisséptico. Os resultados obtidos foram bastante positivos uma vez que a ação do antisséptico, na presença dos óleos essenciais, contra certas espécies de microrganismos foi mais eficaz do que o efeito do antisséptico sozinho (Şimşek *et al.* 2017).

As plantas com efeitos medicinais têm sido bastante usadas no combate a infeções em animais e humanos desde a antiguidade e obtiveram efeitos positivos na prevenção e cura de certas doenças. No entanto, a maior parte das plantas que são usadas na medicina tradicional não foram investigadas cientificamente, sendo por isso essencial a realização de ensaios biológicos de triagem que possam fornecer dados sobre as atividades biológicas dessas mesmas plantas e assim obter-se uma justificação científica para os efeitos que provocam (Turker *et al.* 2012). De facto, a monitorização da atividade antimicrobiana em extratos de plantas mostrou que as plantas representam uma fonte potencial de novos agentes anti-infecciosos (Sassi *et al.* 2007).

1.4 *Arbutus unedo*

O *Arbutus unedo* (medronheiro) pertencente à família *Ericaceae* e à subfamília *Arbutoideae*. É um arbusto perene, aproximadamente com 5 m de altura e encontra-se distribuído por diversas zonas, nomeadamente, na Europa ocidental, central e no sul, no norte de África (exceto no Egito e na Líbia), nas ilhas Canárias e na Ásia ocidental (Miguel *et al.* 2014; Mosele *et al.* 2016b).



Figura 3: Folhas, flores e frutos do medronheiro. (Fonte: <https://www.gardeningexpress.co.uk/arbutus-unedo-strawberry-tree/>)

Os frutos (medronhos) são esféricos com aproximadamente 1,5 a 2 cm de diâmetro, de cor vermelha e quando estão totalmente maduros apresentam um sabor agradável. A maturação do fruto ocorre na altura do Outono e do Inverno e podem ser consumidos frescos ou através de compotas e bebidas alcoólicas (Delgado-Pelayo *et al.* 2016).

As flores são um pequeno grupo de lanternas de cor creme e as folhas, são de cor verde escura, alternadas, coriáceas e dentadas (Oliveira *et al.* 2011).

Esta planta também é importante do ponto de vista ecológico, uma vez que ajuda a manter a diversidade da fauna, evita a erosão dos solos, regenera rapidamente após incêndios, cresce em solos pobres e pode ser usada em fito-remediação por exemplo contra a contaminação com arsénio (Oliveira *et al.* 2011) e é uma fonte de alimento para muitos animais (Nenadis *et al.* 2015).

1.4.1 Compostos presentes no medronheiro

A literatura descreve a existência de compostos fenólicos em diferentes partes do medronheiro tais como, ácidos fenólicos, derivados de ácido gálico, flavan-3-óis, antocianinas e outros flavonoides (Guimarães *et al.* 2014).

Nas folhas do medronheiro existe uma grande variedade destes compostos, mas os que se encontram em maior quantidade são as catequinas, a quercetina e os derivados de quercetina e hiperóxidos (Figura 4) (Miguel *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2011). A quercetina, tem propriedades antioxidantes e parece ter atividade em muitas doenças como o cancro, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (Guimarães *et al.* 2013).

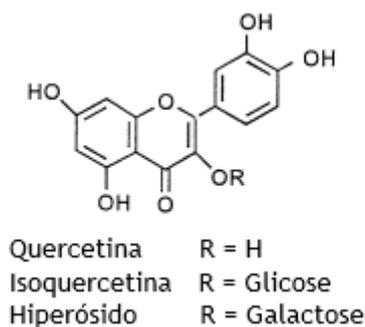


Figura 4: Estrutura química dos flavonóis que se encontram nas folhas do medronheiro (Adaptado de Zhang *et al.* 2001).

Nos frutos do medronheiro, também existem flavonoides de diferentes classes e ao contrário das folhas, possuem antocianinas (Figura 5) e proantocianidinas (Figura 6) (Oliveira *et al.* 2011). As antocianinas, são o grupo de compostos fenólicos naturais responsáveis pelas cores laranja, vermelha e azul de diversas flores, frutos e vegetais. São encontradas principalmente em frutos e têm fortes propriedades antioxidantes, desempenhando um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, neuronais, diabetes e cancro (Guimarães *et al.* 2013; Guimarães *et al.* 2014). Os flavon-3-óis, que constituem as proantocianidinas, também possuem propriedades anti tumorais e podem estar relacionados com propriedades antivirais, anti-inflamatórias e antioxidantes (Miguel *et al.* 2014; Nenadis *et al.* 2015).

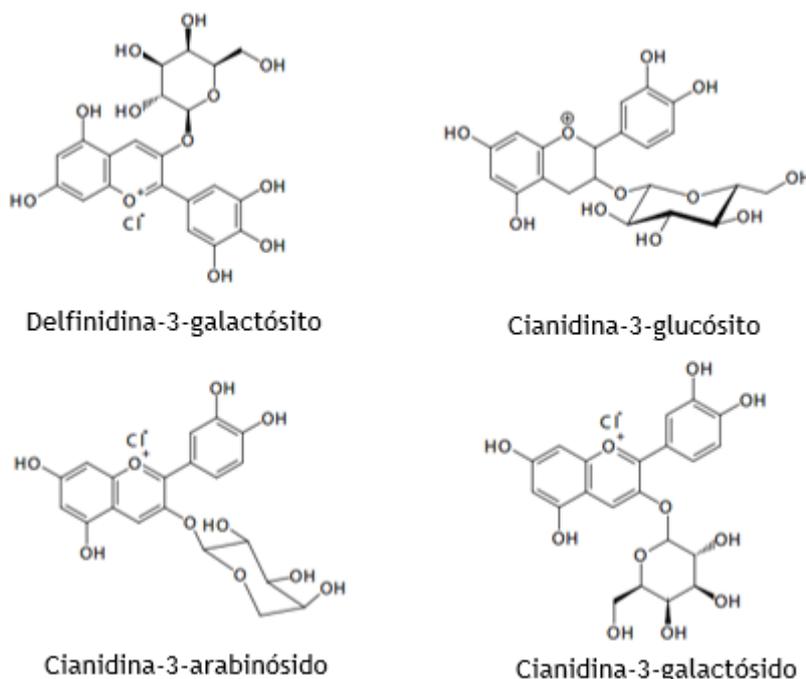


Figura 5: Estrutura química das antocianinas presentes no medronheiro (Adaptado de Oliveira *et al.* 2011).

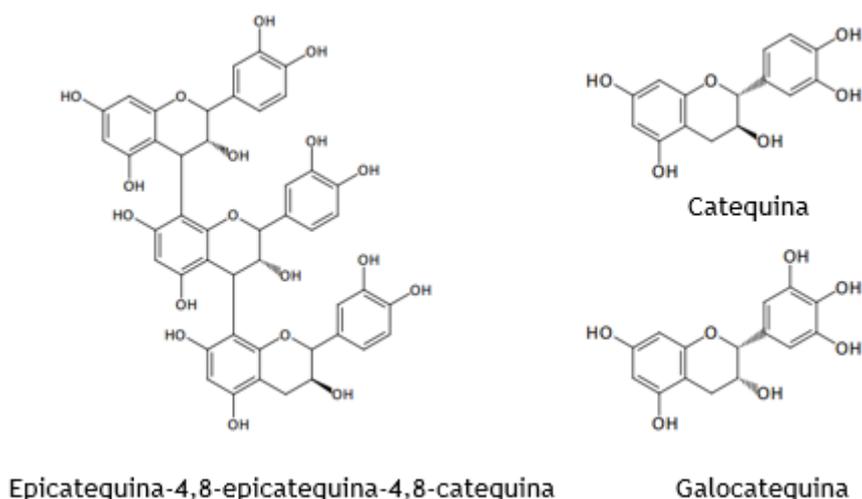


Figura 6: Estrutura química das proantocianidinas e antocianidinas mais comuns no medronheiro (Adaptado de Oliveira *et al.* 2011).

É importante referir ainda que os frutos do medronheiro também apresentam quantidades consideráveis de antioxidantes lipossolúveis, como o α -tocoferol e carotenoides (β -caroteno, luteína, zeoxantina, etc.) (Figura 7) (Mosele *et al.* 2016b). Outros compostos bioativos que estão referidos são os triterpenos (α -amirina, ácido betulínico e lupeol), ácidos orgânicos (ácido málico, fumárico, etc.) (Figura 8) e o ácido ascórbico (Delgado-Pelayo *et al.* 2016; Oliveira *et al.* 2011). Os ácidos gordos insaturados que predominam nos frutos maduros e são o α -linolénico, o linoleico e o oleico e o ácido gordo saturado mais comum é o ácido palmítico (Miguel *et al.* 2014).

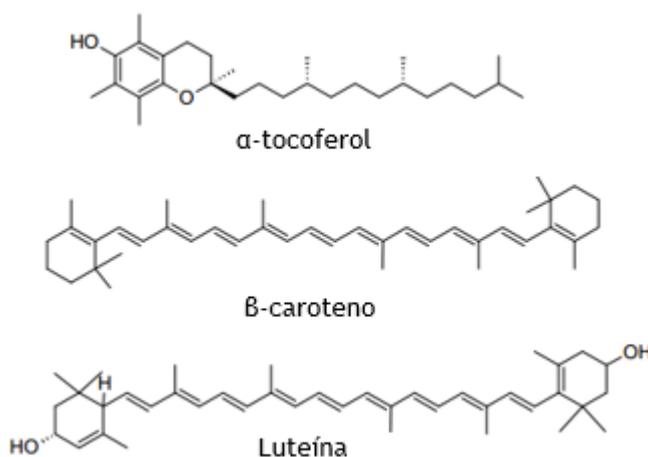


Figura 7: Estrutura química de alguns carotenoides e vitamina E presentes no medronheiro (Adaptado de Miguel *et al.* 2014).

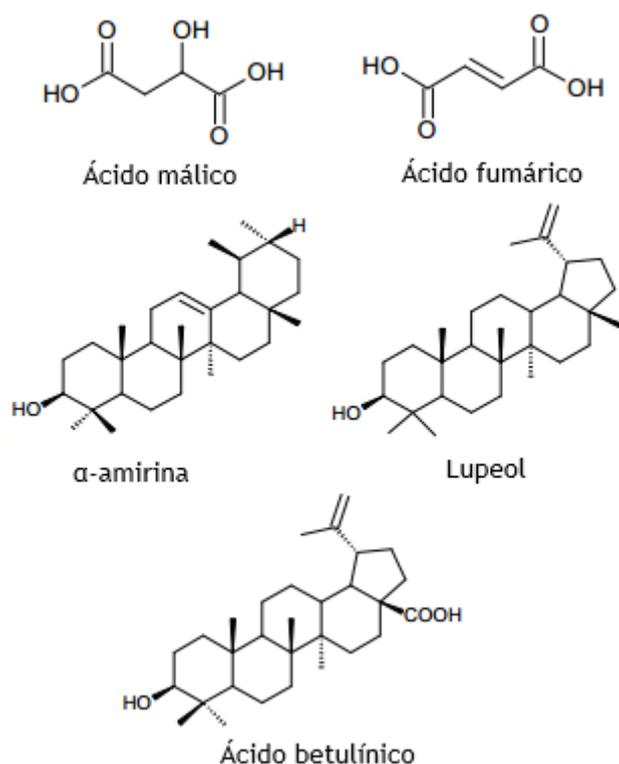


Figura 8: Estrutura química de alguns triterpenos e ácidos orgânicos presentes no medronheiro (Adaptado de Miguel *et al.* 2014).

A constituição das plantas, nomeadamente os compostos fenólicos, pode variar segundo as condições a que estão sujeitas no seu habitat. Por exemplo, a produção de espécies reativas de oxigénio pode estar associada a stress provocados nas plantas que crescem naturalmente, como a radiação UV-B e o défice hídrico, e para responder a esse problema, as plantas podem modificar a morfologia da folha e/ou aumentar o seu teor de compostos fenólicos. Outro fator que pode alterar a quantidade de compostos, pode estar relacionado com as estações do ano. Segundo testes realizados em diferentes alturas do ano, pode-se concluir que existe maior quantidade de compostos fenólicos no Outono e Inverno. Este facto pode estar relacionado com a baixa temperatura que se verifica nessas estações, uma vez que aumenta os níveis de flavonoides para melhorar a tolerância da planta ao frio (Nenadis *et al.* 2015).

Diversos autores destacam a importância dos fenóis na dieta, visto que quando se encontram no intestino grosso, podem interagir com a flora intestinal. Os fenóis presentes nos alimentos são absorvidos no trato gastrointestinal em quantidades substanciais, no entanto, passam do intestino delgado para o intestino grosso. A microbiota humana cataboliza os compostos, levando à produção de diferentes metabolitos fenólicos que podem ser derivados das galotaninos, elagitaninos, flavan-3-óis, antocianinas e ácidos fenólicos (Del Rio *et al.* 2013; Mosele *et al.* 2016a; Mosele *et al.* 2016b). Por outro lado, durante a digestão, os componentes alimentares estão em constante exposição a diferentes condições físicas (temperatura), químicas (pH) e bioquímicas (enzimas). Como consequência disso, a

biodisponibilidade e a bioatividade dos potenciais compostos alimentares são afetadas. De modo a perceber a estabilidade dos compostos fenólicos após a ingestão, Mosele *et al.* 2016a desenvolveram um estudo *in vitro* e concluíram que estes compostos sofrem várias transformações dependendo da sua absorção e metabolismo e o poder antioxidante depende da extensão da absorção e metabolismo desses compostos (Bravo 1998).

1.4.2 Utilização na medicina tradicional e atividade biológica

Os usos tradicionais do medronheiro são diversos e podem ser usadas diferentes partes da planta como as folhas, os frutos, as raízes e a casca (Miguel *et al.* 2014).

As folhas são usadas em infusões ou decocções devido às propriedades adstringentes, anti-hipertensivas, depurativas, antissépticas urinárias, diuréticas, antidiabéticas, antidiarreicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e podem também ser usadas para aplicação direta em doenças de pele, como eczemas ou infeções fúngicas (Guendouze-Boucheffa *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2011). As decocções de folhas podem também ser usadas em banhos refrescantes e contra hemorróidas (Cornara *et al.* 2009). Alguns extratos obtidos a partir das folhas têm atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias Gram positivas (Orak *et al.* 2011), *Helicobacter pylori* (Ferreira *et al.* 2012) e contra certos fungos (Miguel *et al.* 2014).

Foi descrito que extratos de folhas de medronheiro apresentam atividade antioxidante em ensaios com modelos baseados em células humanas. Foi feito um estudo biológico em que usaram eritrócitos humanos para testar a atividade antiradicalar, estudando assim a interação oxidante/antioxidante. Uma vez que, a membrana dos eritrócitos é rica em ácidos gordos poli-insaturados, estes têm elevada probabilidade de sofrerem peroxidação mediada por radicais livres. Os lípidos da membrana quando submetidos a stress oxidativo, perdem um átomo de hidrogénio da cadeia insaturada de acilo, iniciando assim a peroxidação lipídica que se propaga numa reação em cadeia. Neste estudo, os polifenóis dos extratos de medronheiro foram capazes de proteger os eritrócitos do stress oxidativo ou mesmo aumentar a sua resistência contra danos causados por oxidantes (Mendes *et al.* 2011).

Os frutos do medronheiro apresentam elevada atividade antioxidante e pode estar relacionada com a presença de derivados de ácido gálico e/ou à presença de flavan-3-óis (Guimarães *et al.* 2014). São usados para distúrbios gastrointestinais, problemas urinários e dermatológicos, doenças do rim e em aplicações cardiovasculares (Oliveira *et al.* 2011). Delgado-Pelayo *et al.* 2016 referem que os frutos possam ser anti hemolíticos e são usados na eliminação de radicais livres ou seja, podem ser usados como uma fonte natural de antioxidantes (Fonseca *et al.* 2015).

Os extratos obtidos a partir dos frutos do medronheiro apresentam atividade antioxidante *in vitro* e o tipo de extração de fenóis e o estado de amadurecimento pode influenciar a atividade antioxidante. Existem estudos em que utilizaram extratos de frutos de medronheiro para proteger a qualidade de hamburgers de carne de porco. Esses extratos protegem os ácidos gordos poli-insaturados da degradação oxidativa bem como inibem a formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e compostos voláteis e a oxidação de proteínas impedindo a formação de compostos carbonílicos. A utilização de extratos como antioxidantes aumentou as propriedades nutricionais, de segurança e sensoriais deste tipo de hamburgers (Ganhão *et al.* 2010).

Decocções feitas com a casca ou raízes frescas ou secas, podem funcionar como desinfetantes do aparelho urinário, anti-inflamatório, laxante, carminativo, digestivo, odontálgico, cardiotônico, (Guendouze-Bouchefa *et al.* 2015; Guimarães *et al.* 2013) diurético, antidiarreico, melhoram problemas dermatológicos, antihipertensivos, antidiabéticos e podem ter aplicações cardiovasculares (Oliveira *et al.* 2011).

A composição fenólica complexa do medronheiro pode estar relacionada com os efeitos antioxidantes e anticancerígenos. Os compostos fenólicos já foram referidos como defesas naturais contra desordens crônicas. Esta propriedade biológica está relacionada com o aumento da atividade antioxidante e da resposta inflamatória contra a diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, cancro e doenças degenerativas (Mosele *et al.* 2016b). Além de que, a presença de galotaninos nos frutos pode ser uma fonte de agentes antivirais contra o vírus da gripe e o HIV (Mosele *et al.* 2016a).

Dependendo do solvente usado para extração, os extratos podem ainda apresentar atividade anti-leishmaniose e contra micobactérias (Miguel *et al.* 2014). Esta atividade antimicobacteriana pode estar relacionada com os fenóis, presentes nos extratos (El ouarti *et al.* 2012).

1.5 *Crataegus monogyna*

O *Crataegus monogyna* (pirliteiro) pertence à família *Rosaceae* e é um arbusto ou uma árvore pequena que cresce mais ou menos entra 5 a 10 m (Nabavi *et al.* 2015; Nunes *et al.* 2016). Pode ser encontrado na Europa ocidental e central, no Médio oriente e no norte de África (Abuashwashi *et al.* 2016).



Figura 9A e 9B: Folhas, frutos e flores do pirliteiro. (Fonte: A - <http://www.ewburrownursery.co.uk/crataegus-monogyna-hawthorn-1139.html>; B - <http://www.brickfieldspark.org/data/hawthorn.htm>)

O pirliteiro produz pequenas bagas comestíveis de cor vermelho escuro (pilriteiros) que ficam maduras no Outono e podem ser usadas para geleias, compotas, xaropes, bebidas e vinho (Nabavi *et al.* 2015).

1.5.1 Compostos presentes no pirliteiro

Diversos metabolitos secundários foram encontrados em extratos obtidos a partir de diferentes partes do pirliteiro e eles podem variar de ácidos gordos simples a compostos mais complexos como os terpenoides e os compostos fenólicos (Nabavi *et al.* 2015). As estruturas químicas dos flavonoides mais comuns no pirliteiro estão representadas na Figura 10.

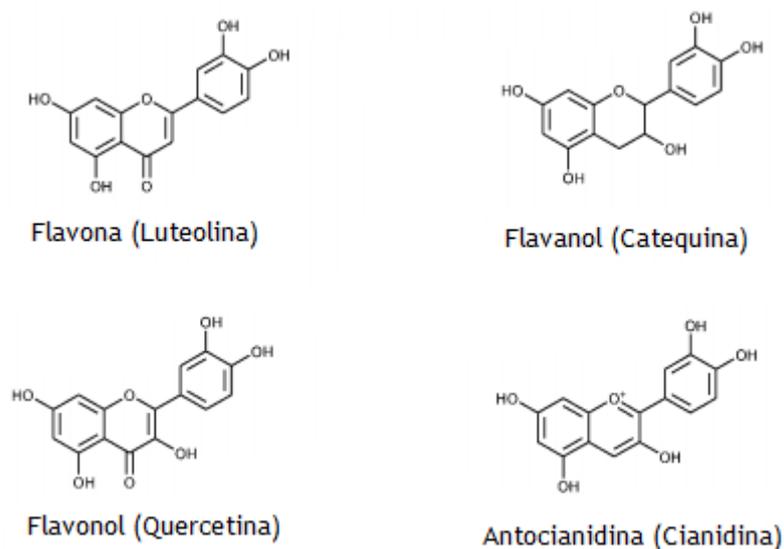


Figura 10: Estrutura química das principais classes dos flavonóides que se encontram no pirliteiro (Adaptado de Nabavi *et al.* 2015).

As folhas e flores possuem flavonoides (flavonas e flavonóis) principalmente na forma de glicósidos (como a quercetina, a vitexina, derivados de vitexina e hiperósidos). Possuem também flavanois (como as procianidinas, catequinas e epicatequina), ácidos triterpênicos (ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido betulínico) (Figura 11), aminas (fenetilamina, acetilcolina, etilamina), ácidos orgânicos (ácido cafeico), (Abuashwashi *et al.* 2016) tocoferóis e ácido ascórbico (Nunes *et al.* 2016).

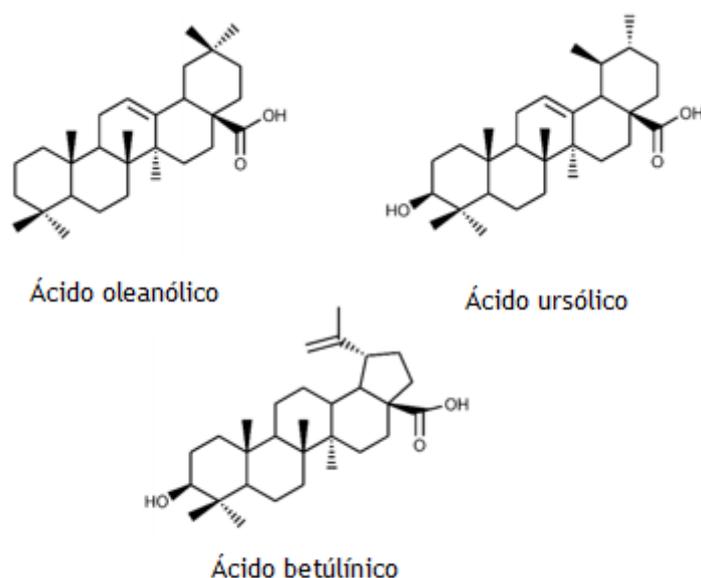


Figura 11: Estrutura química de triterpenos encontrados nas folhas e flores do pirliteiro (Adaptado de Nabavi *et al.* 2015).

Os frutos maduros são ricos em hidratos de carbono e os frutos não maduros em relação aos maduros, possuem mais ácidos gordos polinsaturados (Nunes *et al.* 2016). Apresentam atividade antioxidante forte para a eliminação de radicais livres, devido à presença de diferentes compostos bioativos, como epicatequina, hiperósido, ácido clorogênico, quercetina, rutina, vitexina e procianidinas.

1.5.2 Utilização na medicina tradicional e atividade biológica

Os frutos, folhas e flores são as partes do pirliteiro que são consideradas como as mais ativas (Chang *et al.* 2005). O pirliteiro é usado na medicina tradicional principalmente para o tratamento de vários problemas cardíacos, incluindo insuficiência cardíaca, angina de peito, hipertensão com insuficiência miocárdica, alterações leves de doenças cardíacas,

aterosclerose (Tadić *et al.* 2008), trombozes, cálculos renais, dispneia, inflamações e arritmia (Nabavi *et al.* 2015).

Os frutos são nutritivos e por causa do seu conteúdo em vitaminas e micronutrientes são usados para tratar distúrbios gastrointestinais (indigestão, distensão epigástrica, dor abdominal e diarreia), reumatismo e infecções respiratórias (Nabavi *et al.* 2015; Nunes *et al.* 2016). Reduzem também a hipercolesterolemia e o risco de doenças cardiovasculares (Pliszka *et al.* 2016). O sumo dos frutos pode ser aplicado em preparação tópica para a pele no alívio da dor e rigidez (Barreira *et al.* 2013).

As flores e folhas são usadas no tratamento de distúrbios da função cardíaca, para regular a pressão arterial, palpitações, irritabilidade e exaustão. Estudos farmacológicos mostram que as folhas e flores do pirliteiro provocam um efeito inotrópico positivo, aumentam o fluxo sanguíneo, são antiarrítmicos e têm efeito cardioprotector (Abuashwashi *et al.* 2016).

Na Europa, o pirliteiro é indicado para aliviar sintomas temporários da função cardíaca, como por exemplo a aceleração dos batimentos cardíacos, devido à ansiedade, e como sedativo, bem como agente antiespasmódico, cardiotónico, adstringente e diurético (Nabavi *et al.* 2015; Abuashwashi *et al.* 2016).

Extratos etanólicos das folhas de pirliteiro demonstraram um efeito anti-trombótico em modelos *in vivo* de trombozes induzidas em caudas de ratos induzidas com carragenina. Este modelo permite a observação da progressão da trombose e é um método não invasivo e fácil de aplicar. Eventualmente, estes extratos poderão ser usados como potenciais agentes terapêuticos e mostraram ser bons candidatos para o desenvolvimento de novos agentes anti-trombóticos (Arslan *et al.* 2014). Este tipo de extrato também possui um efeito protetor no cérebro de rato contra lesões, uma vez que mantêm os níveis de glutathiona (GSH) e reduzem a peroxidação lipídica no cérebro durante uma lesão isquémica. Quando ocorre uma lesão no cérebro, os níveis de GSH reduzem significativamente e a restauração dos níveis de GSH após a lesão pode desempenhar um papel fundamental na minimização do dano ao cérebro. O pré-tratamento do rato com extrato de pirliteiro não aumentou a produção de GSH, mas preveniu a oxidação dos níveis de GSH e, portanto, manteve uma quantidade estável de GSH no cérebro durante a lesão. Este efeito protetor pode ser devido à propriedade de eliminação de radicais livres do extrato. O cérebro também é vulnerável à peroxidação lipídica devido ao alto teor de lipídios e estudos realizados mostram que o dialdeído malónico (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, aumenta significativamente depois de uma lesão no cérebro. O pré-tratamento com extrato de pirliteiro reduziu a produção de MDA no cérebro (Elango *et al.* 2009).

Em relação à atividade antimicrobiana, estudos mostram que o pirliteiro tem atividade fraca a moderada principalmente contra bactérias gram positivas e não tem efeito em *Candida albicans* (Nabavi *et al.* 2015).

O tratamento da toxicidade originada por medicamentos é uma questão importante nos dias de hoje para a humanidade. Existem estudos que mostram que extratos obtidos de frutos do pirliteiro contribuem de forma positiva na diminuição de dos efeitos adversos provocados por agentes carcinogénicos (por exemplo o metanossulfonato de metilo), por medicamentos usados na quimioterapia (por exemplo a ciclofosfamida e radiação gama), por imunossupressores (por exemplo, a ciclosporina), entre outros (Nabavi *et al.* 2015).

Os extratos aquosos ou etanólicos de pirliteiro também podem ter um potencial importante em formulações tópicas para aplicações dermocosméticas, tais como géis hidrossolúveis. A inclusão de extratos nos géis hidrossolúveis causou perdas muito limitadas na sua bioatividade (Barreira *et al.* 2013).

Existem extratos comerciais de pirliteiro (WS® 1442 e LI 132) que foram usados em testes clínicos de diversas doenças e posteriormente foram usados para desenvolvimento de medicamentos registados como é o caso do Crataegutt® (Holubarsch *et al.* 2000) e do Crataegisan®. Para este último, os resultados mostraram que pacientes com insuficiência cardíaca toleram melhor o exercício, sem adquirirem efeitos adversos, melhorando bastante com uma terapia a longo prazo (Nabavi *et al.* 2015).

Capítulo 2. Objetivos

Antigamente, quando a produção laboratorial de químicos e potenciais fármacos ainda estavam na fase inicial de desenvolvimento, havia uma tendência crescente da população em geral para utilizar o que estava ao seu alcance, nomeadamente plantas e frutos que facilmente eram colhidos na natureza, de forma intuitiva para curar doenças. Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica esta tendência veio a diminuir, no entanto, na atualidade, devido às novas necessidades económicas e ao aparecimento de novas doenças tem havido uma mudança de mentalidades que tem procurado conjugar o desenvolvimento da indústria química e farmacêutica com o potencial dos produtos naturais, nomeadamente plantas cujas propriedades biológicas são uma mais valia para a saúde, pelo que se tem procurado desenvolver mais estudos sobre os seus potenciais.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de duas plantas usadas na medicina tradicional, o medronheiro e o pirliteiro, e definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Caracterizar a composição fitoquímica dos extratos das folhas destas duas plantas;
- ❖ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos metanólicos brutos;
- ❖ Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos e respetivas frações em espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e em leveduras;
- ❖ Estudar o potencial sinergismo entre os extratos e respetivas frações do medronheiro e do pirliteiro com o antifúngico Anfotericina B.

Capítulo 3. Materiais e Métodos

3.1 Extração das folhas das plantas

As partes aéreas do medronheiro e do pirliteiro foram colhidas na região do Fundão durante o mês de julho de 2016 e as mesmas foram deixadas a secar à temperatura ambiente. Depois de secas, as folhas foram trituradas num desintegrador de lâminas e guardadas à temperatura ambiente para posterior uso.

3.1.1 Preparação dos extratos

Este método consistiu numa adaptação dos métodos de extração referidos por Qi *et al.* 2015 e Parekh *et al.* 2005. A 10 g das folhas trituradas juntou-se 200 mL de metanol e colocaram-se num banho de ultrassons durante 1 h a 40 °C com agitação intermitente. No fim de cada hora, retirou-se o extrato, tendo sido adicionados mais 200 mL de metanol. Repetiu-se este processo 4 vezes.

No fim da extração, descartou-se o resíduo das plantas e o extrato foi centrifugado a 7000 xg, durante 20 min a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante e evaporou-se até à secura, num evaporador rotativo com banho a 40 °C. Os extratos obtidos foram pesados e calcularam-se os respetivos rendimentos da extração pela seguinte expressão:

$$\eta = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

Sendo m_1 a massa final de extrato depois da evaporação e m_2 massa de plantas secas que se pesou para a extração.

Os extratos foram armazenados no frigorífico a -20 °C até serem usados. Foram realizados 3 ensaios da extração do medronheiro e do pirliteiro.

3.2 Determinação dos Fenóis totais

Após a extração das folhas das plantas deu-se início à caracterização fitoquímica dos extratos. Os compostos fenólicos de cada extrato foram determinados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como composto fenólico padrão. Para tal

fez-se uma curva de calibração com soluções metanólicas com 12 concentrações (500-50 mg/L) de ácido gálico (Figura 12) de acordo com o procedimento descrito por Luís *et al.* 2014.

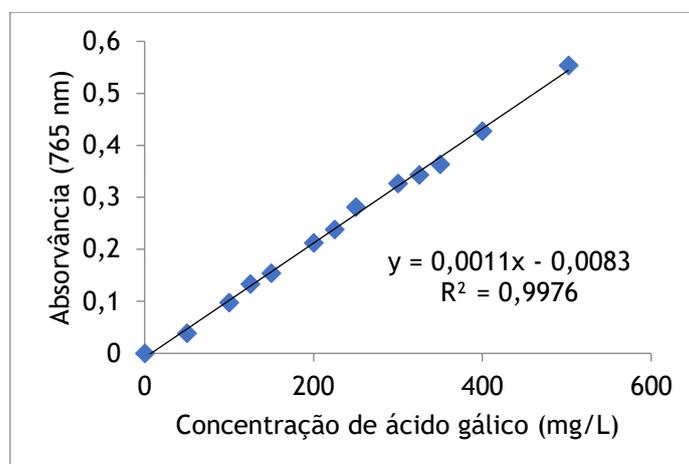


Figura 12: Curva de calibração dos fenóis totais usando o ácido gálico como referência.

A 50 μ L das soluções padrão ou das soluções metanólicas dos extratos (2,5 mg/mL) adicionaram-se 450 μ L de água destilada e 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2N (diluição com água destilada). Deixou-se reagir durante 5 min à temperatura ambiente e de seguida adicionaram-se 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (75 g/L). Colocaram-se num banho a 30 °C durante 90 min, agitando intermitentemente e no fim desta incubação as absorvâncias foram lidas a 765 nm. A solução branco foi elaborada substituindo o ácido gálico por metanol e os ensaios foram feitos em triplicado. Os fenóis totais foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg GAE/g extrato) (Luís *et al.* 2014).

3.3 Determinação dos Flavonoides

Os flavonoides dos extratos de cada planta foram determinados pelo método colorimétrico que usa cloreto de alumínio e a quercetina como padrão. Assim, fez-se uma curva de calibração com soluções metanólicas com diferentes concentrações de quercetina (200- 12,5 μ g/L) (Figura 13), de acordo com o procedimento descrito por Luís *et al.* 2014.

A 500 μ L das soluções padrão e das soluções metanólicas de extratos (2,5 mg/mL), adicionaram-se 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio (10%), 0,1 mL de solução aquosa de acetato de potássio (1M) e 2,8 mL de água destilada. Deixou-se reagir durante 30 min à temperatura ambiente e de seguida leram-se as absorvâncias a 415 nm. A solução branco consistiu na substituição de quercetina por metanol e os ensaios foram

realizados em triplicado. Os flavonoides totais foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por grama de extrato (mg QE/g extrato) (Luís *et al.* 2014).

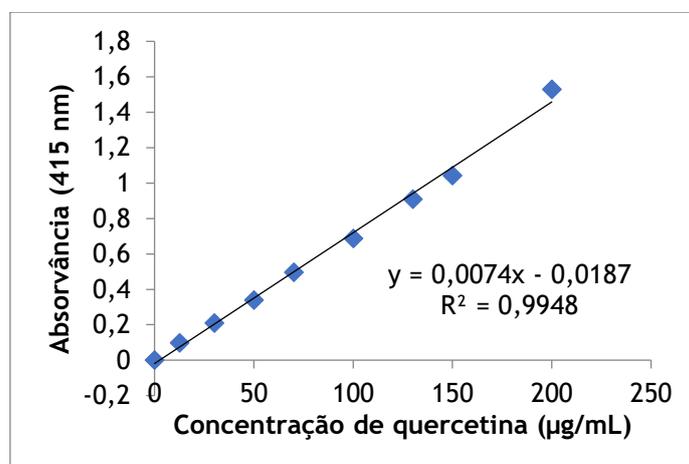


Figura 13: Curva de calibração dos flavonoides usando a quercetina como referência.

3.4 Determinação da Atividade Antioxidante

Após a caracterização da composição fitoquímica dos extratos, procedeu-se então à avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos brutos, recorrendo a duas metodologias com diferentes mecanismos de reação.

3.4.1 Método do DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada através do método da eliminação do radical utilizando o radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) e comparada com vários compostos antioxidantes usados como controlos positivos, nomeadamente a rutina, o trolox e o ácido gálico de acordo com o procedimento descrito por Luís *et al.* 2014.

Para o procedimento do método do DPPH, construiu-se uma curva de calibração (Figura 14) com soluções metanólicas de DPPH com as concentrações referidas na Tabela 1. De forma a medir a atividade antioxidante dos extratos foi necessário preparar diluições dos mesmos, tendo sido usadas as seguintes concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL para as soluções dos extratos a testar.

Tabela 1: Concentrações das soluções metanólicas de DPPH para a curva de calibração.

[DPPH] mM	[DPPH] mg/L
0,011	4,250
0,022	8,500
0,043	17,000
0,065	25,500
0,086	34,000
0,108	42,500
0,130	51,000
0,151	59,500
0,174	68,430
0,196	76,930
0,216	85,000

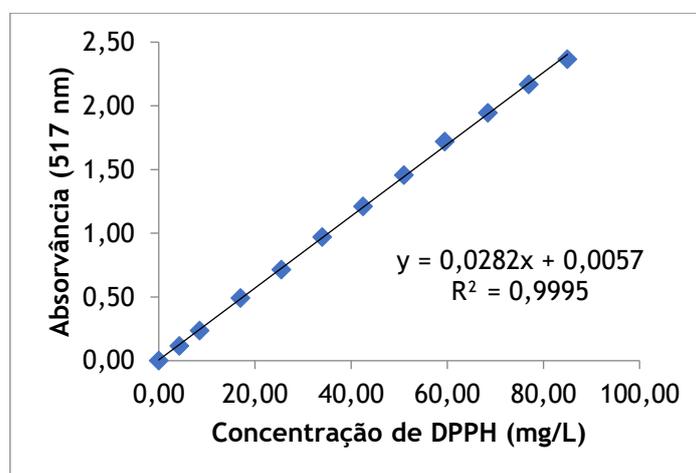


Figura 14: Curva de calibração das soluções metanólicas de DPPH.

Preparam-se 3 soluções metanólicas de DPPH (0,200; 0,1242 e 0,0800 mM) e para cada uma dessas concentrações e para as diferentes concentrações dos extratos, colocou-se em tubos de ensaio 0,1 mL de amostra e 3,9 mL de DPPH e deixou-se incubar 90 min no escuro, à temperatura ambiente. O branco foi construído contendo apenas metanol, tendo também sido feita uma solução controlo substituindo os 0,1 mL de amostra por 0,1 mL de metanol. Os ensaios foram feitos em triplicado e no fim as absorvâncias foram lidas a 517 nm (Luís *et al.* 2014).

A atividade de eliminação de radicais foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_{controlo}^{t=90 \text{ min}} - Abs_{amostra}^{t=90 \text{ min}}}{Abs_{controlo}^{t=90 \text{ min}}} \times 100 \quad (2)$$

O IC₅₀ foi calculado graficamente usando curvas de calibração da concentração de extrato versus a atividade de eliminação radical correspondente.

Assim, para cada concentração de DPPH, determinou-se a percentagem de inibição e as curvas de calibração da concentração de extrato *versus* atividade de eliminação radical das Figura 15, Figura 16 e Figura 17, correspondem ao extrato de medronheiro e os gráficos do extrato de pirliteiro e dos padrões encontram-se em “Anexo I”.

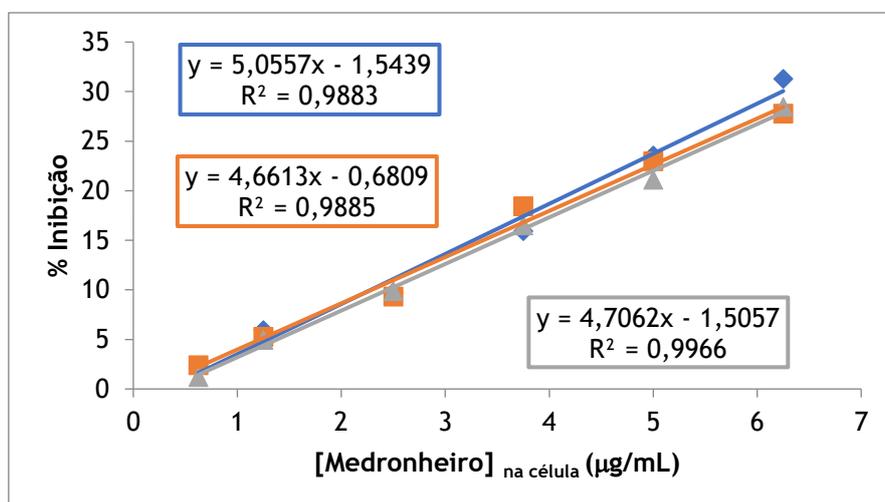


Figura 15: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no extrato de medronheiro.

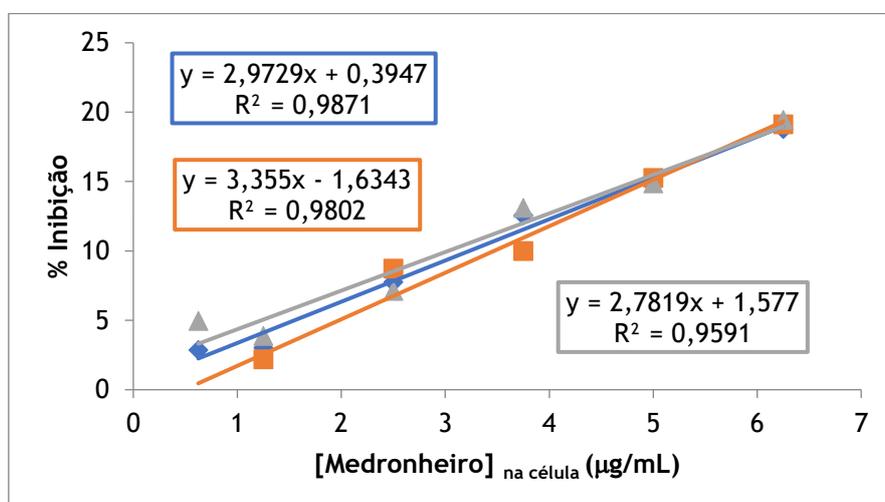


Figura 16: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no extrato de medronheiro.

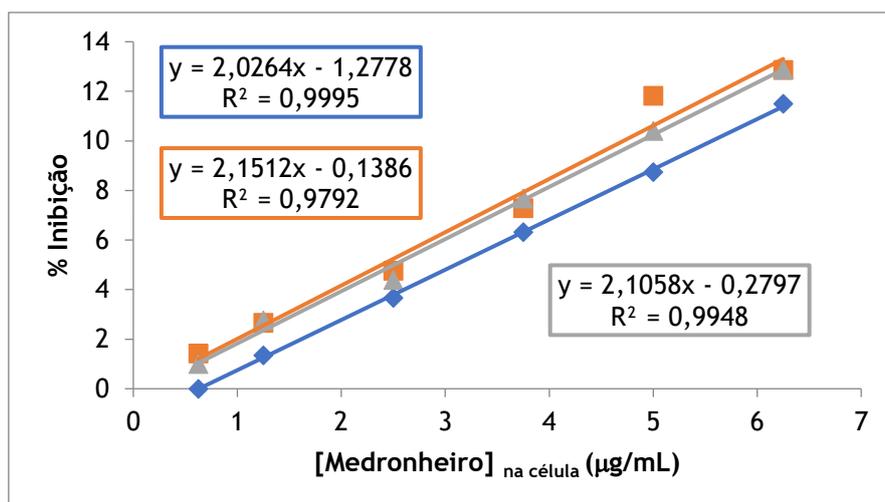


Figura 17: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no extrato de medronheiro.

Tabela 2: Valor obtido de IC₅₀ para o extrato de medronheiro através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.

Extrato de medronheiro		
[DPPH] = 0,080 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	10,195	11,661 ± 1,926
2	13,842	
3	10,944	
[DPPH] = 0,124 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	16,686	16,398 ± 1,022
2	15,390	
3	17,406	
[DPPH] = 0,200 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	25,305	24,163 ± 1,029
2	23,307	
3	23,877	
Média total ± Desvio médio IC ₅₀		
17,407 ± 4,504		

A atividade antioxidante foi expressa através do Índice de Atividade Antioxidante (AAI), calculado a partir da seguinte fórmula (Scherer *et al.* 2009):

$$AAI = \frac{[DPPH]_{controle}^{t=90 \text{ min}} (\mu\text{g/mL})}{IC_{50}} \quad (3)$$

3.4.2 Método que usa o sistema β -caroteno/ácido linoleico

O ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico baseia-se na descoloração do β -caroteno por reação com o radical livre de ácido linoleico. Os antioxidantes presentes em solução podem prevenir a degradação do β -caroteno reagindo com o radical livre de linoleato ou qualquer outro radical formado na solução (Orak *et al.* 2011).

Depois da preparação da solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio), foram adicionados 500 μL a 40 μL de ácido linoleico, 400 μL de Tween 40 e 1mL de clorofórmio. O clorofórmio foi de seguida evaporado num evaporador rotativo durante 5 min com banho a 45 °C e depois, adicionaram-se 100 mL de água destilada saturada com O_2 para formar uma emulsão. Foram adicionados 5 mL da emulsão a 300 μL de cada extrato a testar. Agitaram-se as soluções e deixaram-se a reagir durante 1h num banho a 50 °C. Todos os ensaios foram efetuados em duplicado e as absorvâncias foram lidas a 470 nm às 0h e passado 1h (Luís *et al.* 2017). Após a aquisição dos valores das absorvâncias, calculou-se a percentagem de inibição através da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_{amostra}^{t=2h} - Abs_{controle}^{t=2h}}{Abs_{controle}^{t=0h} - Abs_{controle}^{t=2h}} \times 100 \quad (4)$$

A avaliação da atividade antioxidante através do sistema β -caroteno/ácido linoleico, foi comparada com o padrão de controlo BHT (hidroxitolueno butilado) e, para isso, prepararam-se soluções metanólicas com as concentrações 1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de BHT. Para as soluções metanólicas dos extratos, também foram usadas estas mesmas concentrações (Luís *et al.* 2014).

3.5 Separação dos extratos metanólicos em frações

Os compostos fenólicos dos extratos brutos metanólicos do medronheiro e do pirliteiro foram separados em frações. Este método consistiu numa adaptação do método de partição do extrato bruto referido por Silva *et al.* 2012.

Para separar os extratos metanólicos brutos em frações usaram-se solventes de polaridade crescente, isto é, N-hexano, éter dietílico e água destilada.

Dissolveu-se 1 g de extrato em 50 mL (em triplicado) de N-hexano e centrifugou-se a 5500 xg, 20 min a 4 °C. Guardou-se o resíduo e o sobrenadante foi evaporado num evaporador rotativo com banho a 40 °C obtendo-se assim a **Fração 1**. Ao resíduo, adicionaram-se 50 mL (também em triplicado) de éter dietílico e centrifugou-se a 5500 xg, 20 min a 4 °C. Guardou-se novamente o resíduo e o sobrenadante evaporou-se nas mesmas condições obtendo-se a **Fração 2**. Ao restante resíduo adicionaram-se 50 mL (em triplicado) de água destilada e centrifugou-se durante 20 min a 4 °C, a 10000-17000 xg dependendo do extrato, uma vês que houve diferença na formação de resíduo entre os extratos das duas plantas. Deste modo, o extrato de pirliteiro na fração da água necessitou de uma velocidade maior de centrifugação para que o sobrenadante ficasse totalmente límpido. Evaporou-se o sobrenadante (**Fração 3**) e o resíduo não solúvel que sobrou do extrato (**Fração 4**) num evaporador rotativo com banho a 40 °C.

No fim de cada separação, os solventes dos extratos do N-hexano e do éter dietílico foram evaporados num evaporador rotativo com banho a 40 °C e a água e o resíduo não solúvel foram liofilizados.

Para o medronheiro e para o pirliteiro, separando respetivamente 8,5 g e 9 g de extrato metanólico bruto, obtiveram-se para cada fração as massas que se encontram na Tabela 3.

Tabela 3: Massas totais obtidas para cada fração do medronheiro e do pirliteiro.

Massas totais (g)		
Fração	Medronheiro	Pirliteiro
1	0,404	0,387
2	0,476	0,637
3	5,270	4,110
4	0,430	0,810

3.6 Cromatografia em Camada Fina (TLC)

A composição das frações e extratos brutos do medronheiro e do pirliteiro foi analisada usando cromatografia em camada fina, para o que se prepararam soluções dos extratos brutos e respetivas frações com cerca de 3 mg de extrato e 500 µL de metanol.

As TLC foram realizadas em tinas de vidro usando eluentes com diferentes polaridades: clorofórmio/acetato de etilo (1:1), acetato de etilo/metanol (1:1),

clorofórmio/acetato de etilo (5:2) e clorofórmio/acetato de etilo (2:5). O volume total de eluente na tina foi 14 mL. As placas foram marcadas em triplicado com lápis.

Para visualizar os cromatogramas, recorreu-se à luz ultravioleta a 365 nm e a 254 nm, tendo a revelação sido feita depois com o reagente de Folin-Ciocalteu e com uma solução de DPPH. A utilização destas duas soluções permite a visualização dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante de cada uma das frações obtidas pela separação do extrato bruto de cada planta. (Luís *et al.* 2016)

3.7 Determinação da Atividade Antimicrobiana

3.7.1 Microrganismos e extratos

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos e as respetivas frações foi testada em quatro espécies de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Listeria monocytogenes* LMG 16779), cinco espécies de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Acinetobacter baumannii* LMG 1025) e em quatro espécies de leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida albicans* ATCC 24433, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* de origem clínica e *Candida lusitaniae* de origem clínica).

Os extratos brutos e as respetivas frações do medronheiro e do pirliteiro foram dissolvidos em DMSO a uma concentração final de 100 mg/mL e guardados a 2-8 °C até serem usados.

3.7.2 Conservação dos microrganismos e dos meios de cultura

Todos os microrganismos usados foram conservados em tubos criogénicos a -80 °C em meio adequado com 20% de glicerol, para armazenamento a longo prazo. Para armazenamento a curto prazo durante a realização de testes, as placas com cultura foram conservadas entre 2 a 8 °C envoltas em película aderente. Estas culturas foram provenientes de repicagem em meio sólido adequado e posterior incubação a 37 °C por 24 para bactérias ou 48 h para leveduras.

Os meios Müller-Hinton agar (MHA) e Müller-Hinton broth (MHB) foram usados para crescimento e ensaios das várias espécies de bactérias, com exceção de *L. monocytogenes*, para esta espécie usaram-se os meios Brain heart infusion (BHI) e Brain heart infusion agar

(BHIA). Para as leveduras, os meios usados foram o Sabourard dextrose Agar (SDA) e o Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640).

3.7.3 Suscetibilidade bacteriana dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro por ensaios de difusão em disco

Para avaliar a suscetibilidade de bactérias gram-positivas e negativas aos extratos brutos metanólicos do pirliteiro e do medronheiro usou-se inicialmente o método de difusão em disco. Este método foi realizado de acordo com o recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) segundo a Norma M2-A8 (NCCLS, 2003a).

Assim, antes de cada ensaio as bactérias foram repicadas em placa de agar de meio não seletivo MHA e incubadas na estufa a 37 °C durante 24 h. O inóculo usado no ensaio foi preparado por suspensão direta de colônias isoladas em solução salina isotônica (NaCl 0,85) e a turbidez foi ajustada a 0,5 Unidades de McFarland.

As placas de MHA foram inoculadas uniformemente mergulhando uma zaragatoa na suspensão anterior e esfregando a mesma em toda a superfície do meio. O procedimento foi repetido inoculando a placa em mais duas direções (girando a placa 60°) a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se a zaragatoa na margem da placa.

Em cada disco, colocaram-se 20 µL de DMSO (controle) ou das soluções de extratos brutos, deixaram-se secar os discos e posteriormente aplicaram-se na superfície do agar pressionando de encontro à placa. De seguida, as placas foram invertidas e incubadas durante 20 h a 37 °C. Para a espécie *L. monocytogens* procedeu-se de igual forma, mas usando meio Brain Heart Infusion Agar (BHIA).

Após o período de incubação foram medidos os halos de inibição em mm com o auxílio de um paquímetro. Todas as experiências foram realizadas pelo menos três vezes e os resultados foram apresentados pelo valor médio ± desvio padrão.

3.7.4 Suscetibilidade fúngica dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro por ensaios de difusão em disco

A suscetibilidade de leveduras aos extratos brutos do pirliteiro e do medronheiro foi realizada de acordo com a metodologia descrita na norma CLSI M44A com adaptações (CLSI, 2008).

Assim, o inóculo foi preparado como descrito no ponto 3.7.1 com a alteração de que as leveduras foram repicadas em meio SDA, sendo a cultura incubada a 37 °C durante 48 h. O inóculo foi então distribuído uniformemente nas placas contendo meio SDA. Os discos foram preparados e aplicados nas placas tal como descrito no ponto 3.7.1. As placas foram invertidas e incubadas durante 48 h a 37 °C.

Após o período de incubação foram medidos os halos de inibição em mm com o auxílio de um paquímetro. Todas as experiências foram realizadas pelo menos três vezes e os resultados foram apresentados pelo valor médio \pm desvio padrão.

3.7.5 Suscetibilidade bacteriana dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respectivas frações por ensaios determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A suscetibilidade das bactérias aos extratos brutos metanólicos e às respectivas frações foi avaliada através do teste de microdiluição em meio líquido. Este método foi realizado como recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) segundo a Norma M7-A6 (NCCLS, 2003b).

Assim, o inóculo a usar no ensaio foi preparado por suspensão direta em solução salina isotônica (NaCl 0,85%) de acordo com o ponto 3.7.1, o qual foi de seguida diluído de 1:100 com meio MHB de maneira a que o inóculo fique com aproximadamente o dobro da concentração final de células requeridas para o ensaio (concentração final de células por poço de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL).

Os extratos metanólicos brutos e respectivas frações foram diluídos sucessivamente (1:2) numa placa de 96 poços, com meio MHB, num volume de 50 μ L, contendo o dobro da concentração final em estudo. Posteriormente, adicionou-se 50 μ L de inóculo diluído a um volume final por poço de 100 μ L. Os ensaios foram realizados num intervalo de concentrações de extratos e frações de 2-0,015 mg/mL, usando uma concentração máxima de solvente (DMSO) de 2% (v/v). Em todos os ensaios foram incluídos um controlo de toxicidade do solvente (inóculo com concentração máxima de solvente usada), um controlo de crescimento das estirpes (inóculo e meio MHB) e controlos de esterilidade do meio (meio MHB) e dos extratos e frações (extratos ou frações e meio MHB). As placas foram depois incubadas a 37°C durante 18-24 h. Para a espécie *L. monocytogenes* procedeu-se de igual forma, mas desta vez usando meio BHI em substituição do MHB.

A presença ou ausência de crescimento visível foi observado na placa. De modo a confirmar os resultados adicionou-se a todos os poços, 30 μ L de uma solução de resazurina 0,01% em água seguida de incubação durante 2 h a 37 °C. No caso de haver crescimento e por

sua vez células metabolicamente ativas o reagente é convertido a rosa, em poços sem inóculo ou os poços em que o crescimento foi inibido pelos extratos, o reagente mantém a sua cor azul.

Todas as experiências foram realizadas pelo menos três vezes e os resultados apresentados resultam da moda dos ensaios.

3.7.6 Suscetibilidade de leveduras aos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respectivas frações por ensaios determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A suscetibilidade das espécies de leveduras aos extratos brutos metanólicos e às respectivas frações foi avaliada através do teste de microdiluição em meio líquido. Este método foi realizado como recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) segundo a Norma M27-A2 (NCCLS, 2002), sendo realizado em placas de microdiluição estéreis com 96 poços.

O inóculo a usar no ensaio foi preparado como descrito no ponto 3.7.1, no entanto, a cultura provinha de crescimento das leveduras em meio SDA durante 48 h, tendo-se obtido uma concentração celular da suspensão preparada em solução salina de cerca de 1 a 5×10^6 células/mL. A suspensão foi depois diluída em RPMI 1640 de 1:1000.

As diluições sucessivas dos extratos brutos e respectivas frações foram preparadas de acordo com o ponto 3.7.3., neste caso em meio RPMI 1640 e num volume de 100 μ L. Posteriormente, adicionou-se 100 μ L de inóculo diluído bem homogeneizado de modo a obter-se um volume final do poço 200 μ L, com uma concentração celular de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

A presença ou ausência de crescimento visível a olho nú nas placas foi posteriormente observado.

Todas as experiências foram realizadas pelo menos três vezes e os resultados apresentados resultam da moda dos ensaios.

3.7.7 Bioautografia

Preparam-se as soluções de extrato e respectivas frações com cerca de 3 mg de extrato e 500 μ L de metanol.

Foram colocados os eluentes clorofórmio/acetato de etilo (2:5) para um volume total de 14 mL numa tina de vidro, posteriormente fechada de forma a criar um ambiente saturado. As placas carregadas com as amostras foram colocadas na tina de modo a haver uma subida gradual do eluente pela placa foram, depois retiradas para secagem.

O inóculo das leveduras foi preparado tal como descrito no ponto 3.7.4 e diluiu-se a suspensão de 1:10 com meio RPMI 1640. Após diluição, o inóculo foi colocado em caixas de Petri e as placas de TLC foram mergulhadas no mesmo durante 10 s. Após este tempo, colocaram-se as placas de TLC inoculadas sobre meio sólido SDA e incubaram-se a 37 °C durante 12 h.

Preparou-se ainda, 50 mL de uma solução de MTT (0,2 g/100 mL) à qual foram adicionadas 5 gotas de Triton X100 (1 gota por cada 10 ml) para intensificar a cor do MTT. Esta solução foi então usada para cobrir totalmente a placa, tendo ficado a incubar mais 2 h.

Se nas placas de TLC aparecem zonas mais claras, amareladas, significa que há atividade antifúngica dos compostos separados nas TLC (Shai *et al.* 2008).

3.7.8 Estudo do efeito combinado dos extratos com o antifúngico Anfotericina B

O método de *checkerboard* foi usado para testar o efeito combinado entre os extratos brutos e as frações mais ativas de pirliteiro ou de medronheiro com o antifúngico Anfotericina B.

O inóculo foi preparado de acordo com o que está descrito no ponto 3.7.4 e a suspensão foi depois diluída em RPMI 1640 de 1:1000, de modo a garantir a presença de uma concentração celular final de aproximadamente 1 a 5 x 10³ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL.

Prepararam-se duas microplacas em que numa realizaram-se diluições sucessivas dos extratos ou frações a testar com RPMI 1640, no sentido vertical, ficando como volume final 50 µL. Na outra placa, foram realizadas diluições sucessivas da Anfotericina B, de igual modo com RPMI 1640, no sentido horizontal. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta multicanal, transferiram-se 50 µL da placa com o antifúngico para a placa com o extrato ou fração adicionando-se posteriormente 100 µL de inóculo. A placa foi incubada a 37°C durante 48h.

Como controlo positivo usou-se um poço em que se adicionou meio e inóculo e o poço que serviu de controlo negativo apenas se colocou meio. As concentrações de cada extrato e frações usadas foram escolhidas tendo em conta os valores de CMI previamente determinados. No fim, pretendeu-se observar a presença ou ausência de crescimento visível nas placas.

Os resultados obtidos do efeito combinado dos extratos com a Anfotericina B (Anf B) foram calculados a partir do Índice de concentração inibitória fracionada (FICI), que corresponde à soma do FIC dos extratos e o FIC da Anfotericina B. A concentração inibitória fracionada (FIC) foi definida como a razão do MIC dos extratos/frações em combinação com a Anfotericina B pela CMI do extrato/fração ou da Anfotericina B utilizados isoladamente (Silva *et al.* 2011):

$$FICI = \frac{MIC_{extrato\ em\ combinação\ com\ Anf\ B}}{MIC_{extrato}} + \frac{MIC_{Anf\ B\ em\ combinação\ com\ extrato}}{MIC_{Anfotericina\ B}} \quad (5)$$

Se o $FICI \leq 0,5$ considera-se que há efeito sinérgico, se estiver entre $0,5 < FICI \leq 1$ existe efeito aditivo, se estiver entre $1 < FICI < 4$ é indiferente e se for $FICI \geq 4$ o efeito é antagonista (Roudashti *et al.* 2017).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como médias e desvio padrão ou como valores modais. A fim de determinar a reprodutibilidade das medições, cada ensaio independente foi realizado pelo menos 3 vezes e todos os cálculos foram feitos usando o Microsoft Excel 2016®.

Capítulo 4. Resultados e Discussão

4.1 Extração das plantas

As folhas secas do medronheiro e do pirliteiro foram extraídas com metanol usando um banho de ultrassons e este tipo de extração é conhecido por ampliar os poros do material vegetal facilitando a transferência de compostos deste material para o solvente de extração. Este tipo de extração também pode quebrar as paredes celulares resultando numa maior eficiência de extração de compostos num tempo reduzido de extração (Shortle *et al.* 2014).

Os rendimentos obtidos para o medronheiro e para o pirliteiro foram $24,43 \pm 2,17$ % e $22,24 \pm 3,46$ %, respetivamente. Comparando com rendimentos obtidos noutros trabalhos, podem existir diferenças significativas, principalmente quando são utilizadas diferentes condições de extração e polaridades do solvente, uma vez que influenciam a eficiência da extração (Nunes *et al.* 2016). Por exemplo, usando o mesmo solvente e o mesmo tipo de extração, Oliveira *et al.* 2009 obtiveram $22,85 \pm 1,01$ %, enquanto que Jurica *et al.* 2017 obtiveram um rendimento ligeiramente superior, 32,4 % para a extração do medronheiro. Nas extrações com diferentes métodos, os rendimentos obtidos por Sassi *et al.* 2007 e Orak *et al.* 2011 foram respetivamente, 28,4% e $41,53 \pm 1,67$ % para extratos de medronheiro e para extratos de pirliteiro, Simirgiotis 2013 obteve 8,90 %. No entanto, os rendimentos de extração também podem ser afetados pela localização onde as plantas são colhidas, e podemos ver essas diferenças nos resultados de Abuashwashi *et al.* 2016, que mostram que os rendimentos podem variar entre 6,66 % e 13,16 %, dependendo do local de colheita.

4.2 Determinação dos Fenóis totais

Os compostos fenólicos são constituintes importantes das plantas devido à sua capacidade de eliminação de radicais livres e a concentração fenólica total pode ser utilizada como triagem rápida da atividade antioxidante (Orak *et al.* 2011).

O conteúdo de fenóis totais nos extratos de medronheiro e de pirliteiro foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu e os resultados podem ser observados na Figura 18.

O extrato de medronheiro possui $202,533 \pm 5,822$ mg GAE/ g e o extrato de pirliteiro $110,412 \pm 1,470$ mg GAE/ g extrato.

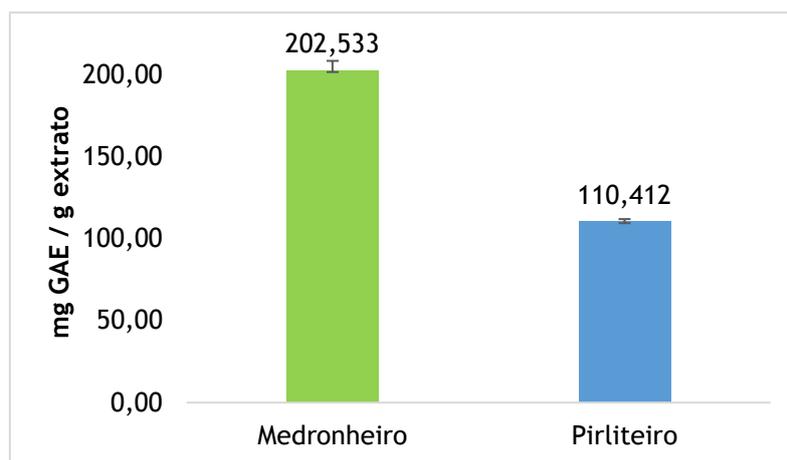


Figura 18: Teor de fenóis totais presentes em cada um dos extratos brutos metanólicos das plantas (média de três determinações \pm desvio padrão).

Tendo em conta o mesmo solvente de extração, foram descritos resultados similares aos nossos e alguns inferiores em relação aos níveis de fenóis totais determinados em folhas do medronheiro. Guendouze-Bouchefa *et al.* 2015, Orak *et al.* 2011, Oliveira *et al.* 2009 e Jurica *et al.* 2017 obtiveram respetivamente, $179,6 \pm 6,7$ mg GAE/ g, $169,05 \pm 0,82$ mg GAE/ g, $149,28 \pm 5,33$ mg GAE/ g e $96,96$ mg GAE/g para os extratos de medronheiro. No extrato de pirliteiro, Simirgiotis 2013 apresenta resultados equivalentes aos nossos ($114,38 \pm 1,62$ mg GAE/ g) nos extratos das folhas e compara com partes diferentes da planta como os frutos, concluindo que as folhas apresentam maior quantidade de compostos fenólicos que os frutos.

Do mesmo modo que comparam as diferentes partes de uma planta, também existem estudos que comparam diferentes solventes de extração, é o caso de Nunes *et al.* 2016 que para o extrato de pirliteiro, concluíram que com a junção dos solventes água e etanol obtêm maior quantidade de fenóis do que se fizerem extração com estes solventes separados. No extrato de medronheiro, comparando a água com o metanol, este último extrai mais compostos fenólicos do que a água (Jurica *et al.* 2017), no entanto, Oliveira *et al.* 2009 obtiveram mais compostos fenólicos na extração aquosa, mas quantidades mais baixas do que na extração etanólica.

Esta divergência nos resultados, além das metodologias, pode estar relacionada com a preparação de amostras, as condições climáticas ou a colheita de amostra (Jurica *et al.* 2017). Abuashwashi *et al.* 2016 colheram pirliteiro em 9 zonas diferentes de Espanha e puderam observar a diferença do conteúdo fenólico nestas amostras. Num estudo diferente, Nenadis *et al.* 2015, viram como as estações do ano, a radiação ultravioleta e a precipitação afetam a quantidade de compostos fenólicos. As quantidades mais elevadas destes compostos foram encontradas no outono e / ou no inverno e os valores mais baixos foram registados na primavera.

4.3 Determinação dos Flavonoides

Os flavonoides são o grupo mais comum e amplamente distribuído de fenóis nas plantas e demonstraram ser altamente eficazes na eliminação da maioria dos tipos de moléculas oxidantes, que podem estar envolvidas em danos no DNA e na promoção de tumores (Barros *et al.* 2010).

O conteúdo de flavonoides nos extratos de medronheiro e de pirliteiro foram determinados de forma espectrofotométrica utilizando o método do cloreto de alumínio e calculados como equivalentes de quercetina.

O conteúdo de flavonoides dos extratos, em termos de equivalentes de quercetina, é muito similar para ambas as espécies. O extrato de medronheiro possui $26,845 \pm 1,123$ mg QE/ g e o extrato de pirliteiro $29,937 \pm 1,847$ mg QE/ g (Figura 19).

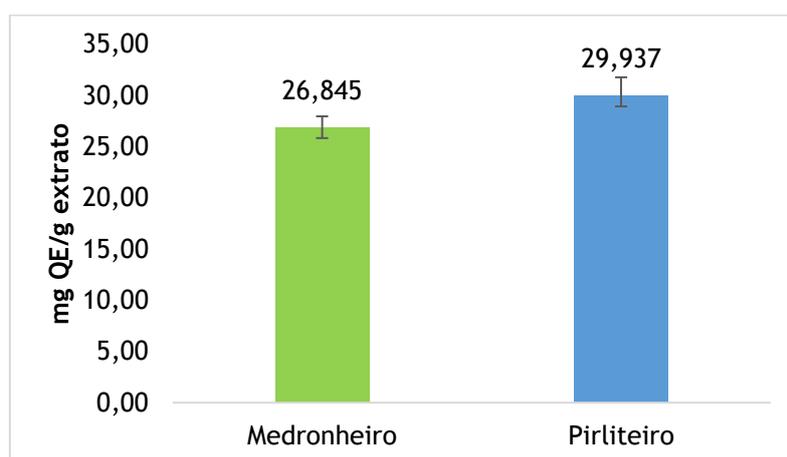


Figura 19: Teor de flavonoides presentes em cada um dos extratos brutos metanólicos das plantas (média de três determinações \pm desvio padrão).

Existem vários estudos de comparação das condições de extração para os compostos fenólicos e do mesmo modo também se encontram para os flavonoides. As condições que os autores Nunes *et al.* 2016, Simirgiotis 2013 e Nenadis *et al.* 2015 testaram para os compostos fenólicos, também estudaram para os flavonoides e comparando com os resultados do presente trabalho, podemos observar algumas diferenças. Simirgiotis 2013 obteve uma quantidade superior de flavonoides, $64,9 \pm 0,00$ mg QE/ g, para o extrato das folhas de pirliteiro e concluiu que existem mais flavonoides nas folhas que nos frutos. Para o extrato de medronheiro, Guendouze-Bouchefa *et al.* 2015 obteve um valor similar ($21,4 \pm 0,01$ mg QE/ g) ao nosso. Em relação aos solventes água e etanol, Nunes *et al.* 2016 verificou que o etanol absoluto é mais eficaz para extração de flavonoides do que a água ou o efeito combinado

destes dois solventes. Com o estudo de Nenadis *et al.* 2015, apurou-se que as estações do ano influenciam a quantidade de flavonoides e que a maior produção é no outono/ inverno.

4.4 Determinação da Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos de plantas depende em grande parte da composição do extrato e é influenciada por muitos fatores que não podem ser descritos com precisão apenas com um único método (Oliveira *et al.* 2009). Assim, no presente trabalho, as propriedades antioxidantes de extratos das folhas do medronheiro e do pirliteiro foram medidas usando dois ensaios diferentes: o método do DPPH e o do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

4.4.1 Método do DPPH

O radical DPPH tem uso generalizado na avaliação da atividade de eliminação de radicais livres por causa da facilidade desta reação (Orak *et al.* 2011). Este radical livre é estável e possui um máximo de absorção característico entre 515 e 517 nm (Oliveira *et al.* 2009). O decréscimo da absorção da solução de DPPH ocorre quando os extratos antioxidantes ou as soluções padrão reduzem o DPPH à sua forma reduzida de hidrazina (Orak *et al.* 2011). Considerou-se que os extratos apresentaram atividade antioxidante fraca quando $AAI \leq 0,5$; atividade antioxidante moderada entre $0,5 < AAI \leq 1,0$; atividade antioxidante forte $1,0 < AAI < 2,0$ e muito forte quando $AAI \geq 2,0$ (Scherer *et al.* 2009).

A partir dos gráficos concentração *versus* % inibição calculou-se o IC_{50} para o extrato de medronheiro. Este parâmetro (IC_{50}) permite saber a concentração de amostra que é necessária para promover 50% de inibição dos radicais de DPPH e (Nunes *et al.* 2016) quanto menor for o valor IC_{50} , mais forte é a capacidade antioxidante (Simirgiotis 2013). Os dados obtidos permitiram demonstrar que em relação à atividade de eliminação radicalar, o extrato do medronheiro apresenta maior potencial ($17,407 \pm 1,326 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 4), uma vez que o valor de IC_{50} obtido para o pirliteiro é superior ($36,111 \pm 2,111 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados são sugestivos que o extrato de medronheiro necessita de uma menor concentração, do que o extrato de pirliteiro, para exercer um efeito inibitório maior. Os valores obtidos de IC_{50} para os padrões rutina, trolox e ácido gálico mostram que estes possuem atividade antioxidante mais potente que os extratos e dentro dos padrões o que apresenta maior efeito é o ácido gálico, seguido do trolox e por fim a rutina.

Para o extrato de medronheiro obteve-se um AAI igual $2,788 \pm 0,232$ e para o extrato de pirliteiro o AAI $1,408 \pm 0,102$ (Tabela 4, Figura 20). Assim, o extrato de medronheiro tem

atividade antioxidante muito forte, visto que o AAI é maior que 2,0 e o extrato de pirliteiro tem atividade antioxidante forte pois o AAI encontra-se entre 1,0 e 2,0. Tendo em conta que existem evidências que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante (Belkhir *et al.* 2013), o extrato de medronheiro possui mais compostos fenólicos do que o extrato de pirliteiro, logo podemos afirmar que os resultados da determinação dos compostos fenólicos corroboram com os resultados da atividade antioxidante.

Tabela 4: Valores de IC₅₀, índice da atividade antioxidante e atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos e dos respectivos padrões. (Média de três determinações ± desvio médio).

	IC ₅₀ (mg/mL)	AAI	Atividade antioxidante
Medronheiro	17,407 ± 4,504	2,793 ± 0,178	Muito forte
Pirliteiro	36,014 ± 11,634	1,410 ± 0,015	Forte
Rutina	8,201 ± 2,109	5,990 ± 0,357	Muito forte
Trolox	7,765 ± 2,523	6,452 ± 0,077	Muito forte
Ácido Gálico	2,009 ± 0,565	23,956 ± 1,407	Muito forte

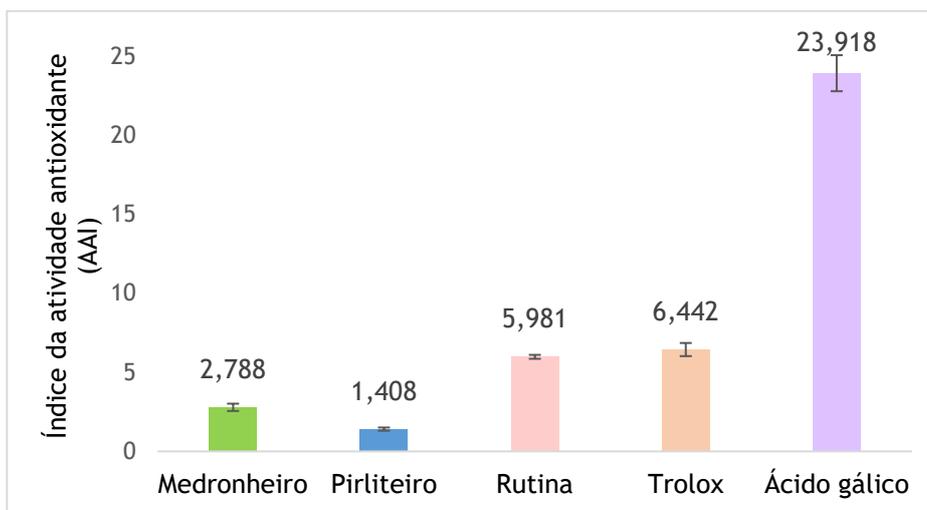


Figura 20: Índice da atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos e dos padrões. (Média de três determinações ± desvio médio).

Comparando estes resultados com extratos aquosos e etanólicos de folhas de pirliteiro, os extratos metanólicos do presente trabalho apresentam menor atividade antioxidante que os extratos aquosos ou etanólicos referidos por Nunes *et al.* 2016, e os extratos etanólicos (IC₅₀ = 43,14 ± 2,02 µg/mL) foram agentes eliminadores de radicais mais poderosos do que os extratos aquosos (IC₅₀ = 61,14 ± 4,00 µg/mL), o que pode ser explicado pelas diferenças nas plantas, nos solventes usados e nos métodos de extração utilizados. Em relação aos extratos metanólicos obtidos das folhas de pirliteiro, resultados de outros autores

demonstraram um potencial de eliminação do radical DPPH superior ($IC_{50} = 3,34 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$) (Simirgiotis 2013). Mais uma vez é de referir que há vários fatores que influenciam a constituição e atividade dos extratos e novamente podemos observar que amostras colhidas em diferentes zonas vão ter valores diferentes de IC_{50} , como se pode verificar no estudo de Abuashwashi *et al.* 2016 sendo que esses valores também denotam atividade antioxidante superior ao extrato deste trabalho (valores de IC_{50} inferiores a $3,76 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$).

Os extratos das folhas de medronheiro foram estudados por outros autores comparando o solvente usado na extração e verificou-se que os extratos metanólicos têm uma atividade antioxidante mais reduzida que os extratos aquosos e extratos etanólicos (Oliveira *et al.* 2009). Comparando com os resultados deste trabalho, estes extratos obtiveram valores de IC_{50} superiores, tal como os resultados obtidos por Jurica *et al.* 2017 ($0,040 \text{ mg/mL}$) e Orak *et al.* 2011 ($0,423 \text{ mg/mL}$). Os extratos aquosos de Moualek *et al.* 2016 ($7,956 \pm 0,278 \mu\text{g/mL}$) possuem uma atividade antioxidante mais forte, tal como os extratos metanólicos de Guendouze-Bouchefa *et al.* 2015 ($3,8 \pm 0,2 \text{ mg/L}$). A literatura refere que a atividade de eliminação do radical DPPH pelos extratos de medronheiro varia com as estações do ano, em que os valores mais baixos foram registados na primavera, tendo-se verificado um efeito interativo da radiação UV e da disponibilidade de água nos resultados dos ensaios do DPPH (Nenadis *et al.* 2015). Estes dados aparentemente discordantes devem ser cuidadosamente investigados e, de fato, as diferenças qualitativas e quantitativas dos compostos fenólicos podem estar correlacionadas com o seu poder antioxidante (Guendouze-Bouchefa *et al.* 2015), pois uma relação significativa entre a quantidade total de fenóis e a atividade antioxidante das folhas sugere que os compostos fenólicos podem ser os principais contribuintes para as propriedades antioxidantes das folhas do medronheiro (Nenadis *et al.* 2015).

4.4.2 Método do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos foi ainda determinada pelo método do sistema β -caroteno/ácido linoleico, método que consiste na avaliação da inibição da peroxidação lipídica mediada por radicais livres. A peroxidação lipídica recebeu especial atenção em relação ao stress oxidativo *in vivo*, uma vez que está associada a processos oxidativos que originam certas doenças e foi relatado que diferentes compostos bioativos possuem atividade biológica contra a peroxidação lipídica atuando como antioxidantes dadores de hidrogénio que reagem com os radicais impedindo assim a peroxidação lipídica. (Morales *et al.* 2013)

Os dados obtidos encontram-se representados na Figura 21 e como se pode observar, pela análise do referido gráfico, o extrato do medronheiro inibe mais a peroxidação que o extrato de pirliteiro, no entanto, ambos têm menor atividade antioxidante que o BHT. Para a

mesma concentração dos extratos e padrão (BHT), na concentração de 500 µg/mL, a atividade de branqueamento de β-caroteno do medronheiro (21,74 ± 3,25 %) e do pirliteiro (6,45 ± 10,93 %) foi menor que no BHT (82,08 ± 1,10 %). É ainda notório que o extrato de pirliteiro só começa a ter percentagem de inibição a partir aproximadamente dos 300 µg/mL mas para ambos os extratos a atividade antioxidante aumenta com as concentrações crescentes de extrato usado.

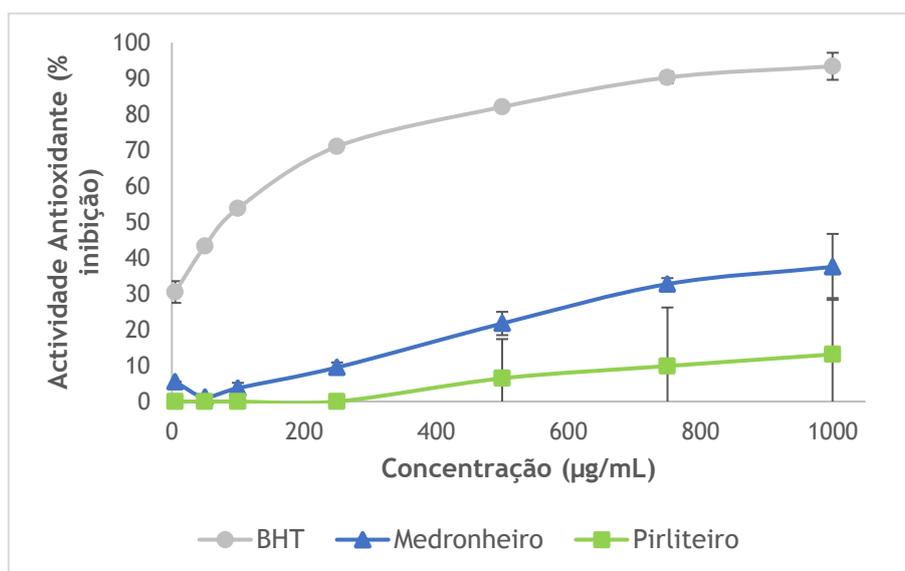


Figura 21: Atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos e do padrão BHT.

No estudo de Orak *et al.* 2011, em extratos metanólicos das folhas de medronheiro, a percentagem de inibição obtida foi de 55,20 ± 1,21 % e 91,10 ± 0,26 % para o BHT na concentração de 50 µg/mL de extrato. Estes valores são significativamente superiores aos resultados obtidos no presente trabalho, pois para a mesma concentração, obtiveram-se os valores de 43,30 ± 3,03 % e 1,22 ± 0,00 % para o BHT e extrato de medronheiro, respetivamente, mostrando que nos resultados deste trabalho os extratos têm capacidade inferior para inibir a peroxidação lipídica. Estas diferenças poderão estar relacionadas com a metodologia, mas também com as características das plantas usadas.

Moualek *et al.* 2016 compararam com extratos aquosos das folhas de medronheiro, obtendo inibições de 96,88 ± 0,34 % para o BHT e 87,04 ± 1,21 % para o medronheiro na concentração de 1000 µg/mL. Nesta concentração os resultados deste trabalho também foram inferiores, 93,41 ± 3,77 % para o BHT e 37,51 ± 9,20 % para o medronheiro, mas muito semelhante no caso do padrão, o que permite dizer que as condições experimentais são comparáveis. No entanto, os extratos metanólicos continuam a apresentar capacidade inferior para inibir a peroxidação lipídica. Neste caso é de referir que se usaram solventes diferentes e essa diferença pode estar associada ao tipo de solvente usado. Barreira *et al.* 2013, comparam extratos etanólicos e aquosos de folhas de pirliteiro e observaram que existe uma

diferença considerável entre a atividade antioxidante dos diferentes extratos e que o extrato etanólico possui maior atividade antioxidante que o extrato aquoso.

Assim, a partir da análise destes dois métodos de determinação da atividade antioxidante, podemos dizer que estes resultados parecem corroborar os resultados anteriormente obtidos no método do DPPH, podendo concluir-se que nestes extratos, o de medronheiro apresenta maior atividade antioxidante que o extrato de pirliteiro. Este método permite ainda observar que a capacidade de inibição da peroxidação lipídica é dependente da dose até uma determinada concentração.

4.5 Separação dos extratos metanólicos em frações

Os extratos metanólicos brutos do medronheiro e do pirliteiro foram separados em quatro frações cada, usando solventes de polaridade crescente para se obterem os seguintes extratos: N-hexano (fração 1), éter dietílico (fração 2), água (fração 3) o resíduo não solúvel restante ficou a fração 4. Assim, obtiveram-se uma ampla gama de metabolitos secundários separados pela sua polaridade nas diferentes frações (Marioni *et al.* 2017).

A composição das frações e extratos brutos do medronheiro e do pirliteiro foi investigada usando cromatografia em camada fina (TLC).

No primeiro ensaio usou-se clorofórmio/acetato de etilo 1:1 e acetato de etilo/metanol 1:1 como eluentes. Visualizaram-se os cromatogramas nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm e os como se observava melhor as bandas no comprimento de onda 365 nm, passou-se a usar apenas este comprimento de onda nos restantes ensaios. Assim, pode-se observar que os solventes clorofórmio/acetato de etilo separaram mais compostos que os solventes acetato de etilo/metanol (Figura 22 e Figura 23). No entanto, não houve grande separação dos compostos em diferentes bandas.

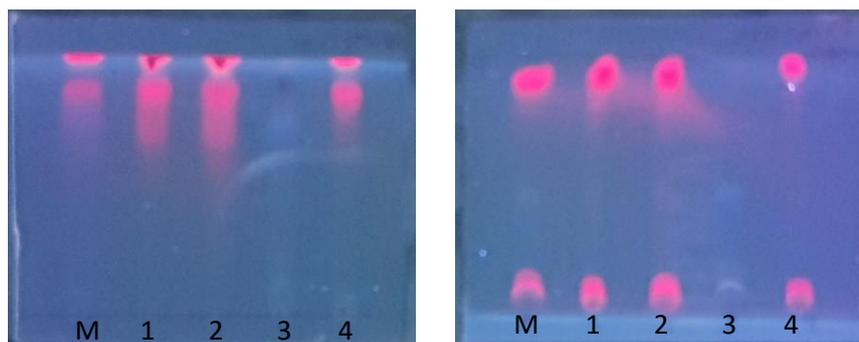


Figura 22: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 1:1 e no cromatograma do lado direito usou-se acetato de etilo/metanol 1:1.

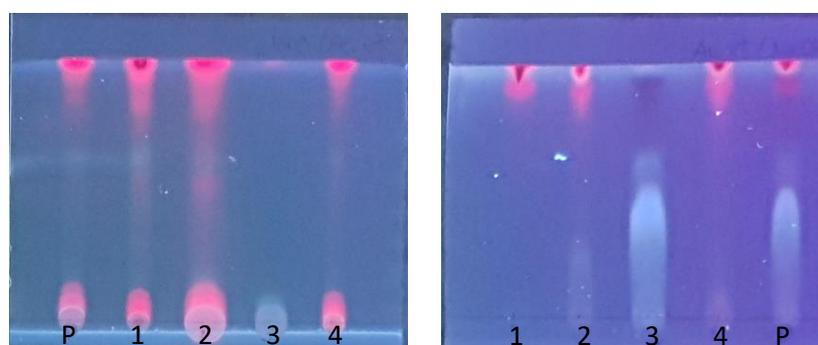


Figura 23: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 1:1 e no cromatograma do lado direito usou-se acetato de etilo/metanol 1:1.

De seguida, tendo em conta que se observou uma melhor separação dos compostos nos solventes clorofórmio/acetato de etilo, alterou-se a polaridade mudando as proporções e em vez de se usar 1:1, usou-se 2:5 e 5:2 de clorofórmio/acetato de etilo. Deste modo, os compostos ficaram separados em mais bandas devido à diferença de polaridade dos solventes, uma vez que os compostos vão interagir mais com a fase móvel e deslocam-se. Assim, conseguiu-se observar mais bandas tanto nos cromatogramas do medronheiro como nos do pirliteiro (Figura 24 e Figura 25). Para os extratos de cada uma das plantas, a proporção 2:5 separou mais os compostos, sendo possível visualizar melhor as bandas nestes cromatogramas. O aparecimento de mais bandas pode ser devido à presença de compostos polares existentes nas amostras. Na proporção 2:5, o solvente que está em maior quantidade é mais polar que o outro, por isso consegue interagir mais com os compostos polares de modo a deslocá-los, visualizando melhor as bandas existentes.

Os extratos brutos (M e P nos cromatogramas) apresentam bandas que também se vêm nas outras frações do cromatograma (1, 2, 3 e 4 nos cromatogramas), o que era de prever

visto que as frações foram obtidas através da separação do extrato bruto metanólico de cada planta. Pode-se concluir também que as frações são diferentes, a fração 3, é diferente das outras uma vez que apresenta uma banda que as outras frações não têm.

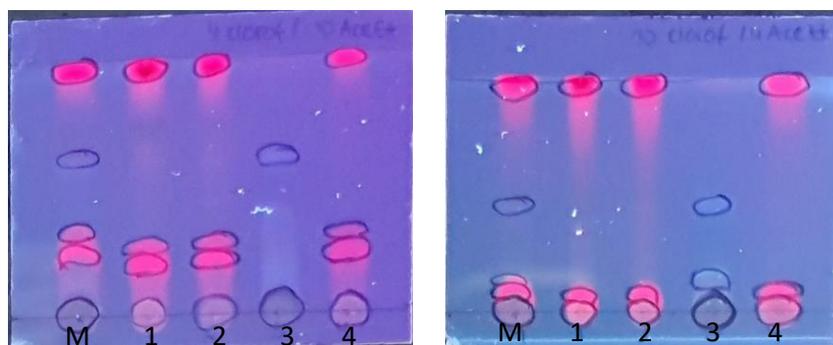


Figura 24: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2.

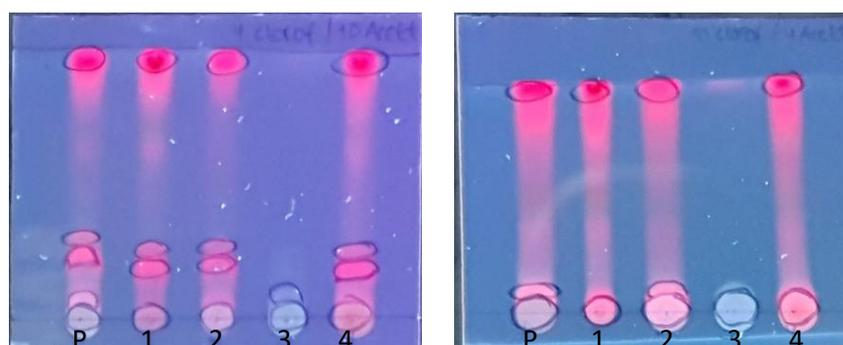


Figura 25: Cromatogramas do extrato e respectivas frações do pirliteiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2.

Procedeu-se a uma avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos e respectivas frações por aplicação de uma solução de DPPH para revelar os cromatogramas. Nos cromatogramas onde aparecem manchas brancas/amareladas, significa que existe atividade antioxidante nessa zona, ou seja, existem compostos nos extratos que são antioxidantes. Nos cromatogramas dos extratos do medronheiro e do pirliteiro, nas zonas assinaladas, pode-se ver que existem zonas mais claras em relação ao fundo de cor lilas (Figura 26 e Figura 27). Analisando a atividade antioxidante visualmente a partir dos cromatogramas podemos dizer que nos extratos do medronheiro a fração 4 é a que apresenta menos atividade antioxidante e no caso do pirliteiro é a fração 1. A fração 1 é a mais apolar obtida com o N-hexano e a fração 4 é a parte não solúvel do extrato que sobrou depois de se ter feito a separação em frações.

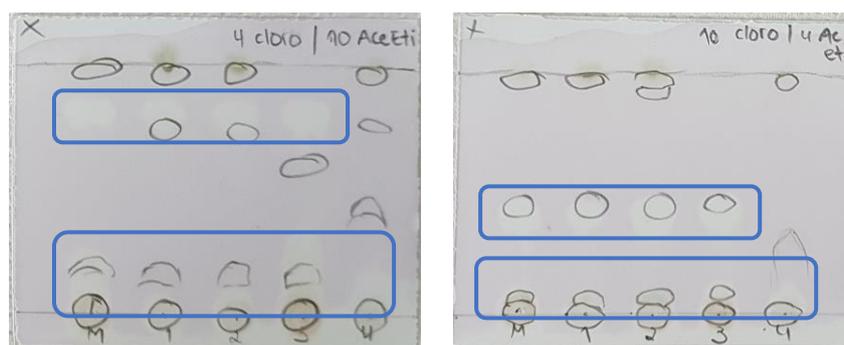


Figura 26: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de DPPH.

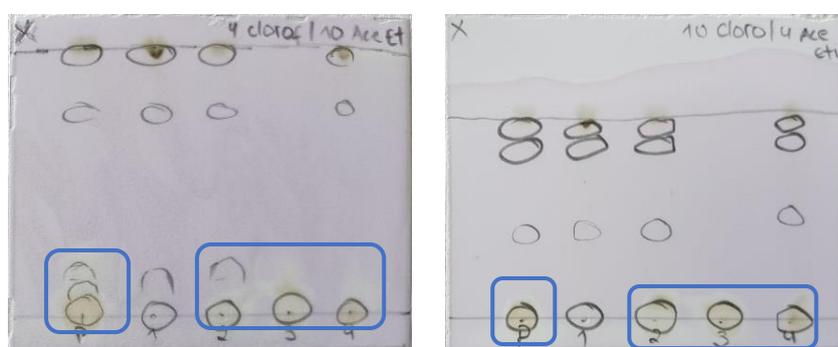


Figura 27: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de DPPH

De modo a avaliar a presença de compostos fenólicos nos extratos brutos e respectivas frações, preparou-se uma solução com o reagente de Folin-Ciocalteu também para revelar os cromatogramas e neste caso a presença destes compostos permite a visualização de zonas azuladas. Nos cromatogramas dos extratos do medronheiro (Figura 28), podemos ver que a fração 3, possui mais compostos fenólicos que as restantes frações. No entanto, todas possuem fenóis.

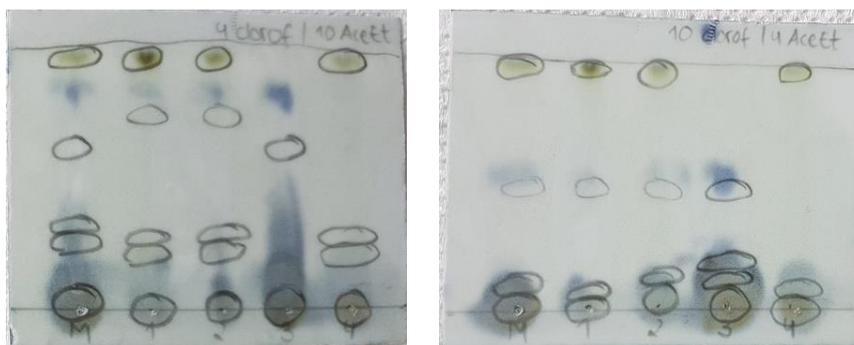


Figura 28: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do medronheiro. No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de Reagente de Folin-Ciocalteu.

Nos cromatogramas dos extratos do pirliteiro (Figura 29), verifica-se uma menor intensidade da cor azul, mas o extrato bruto e todas as frações, exceto a fração 1, também possuem compostos fenólicos.

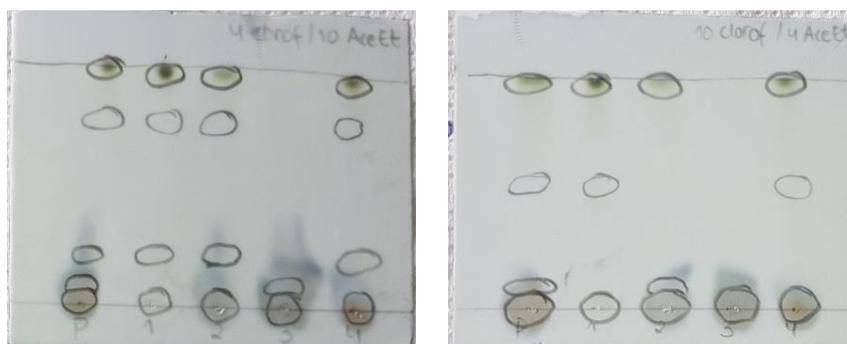


Figura 29: Cromatogramas do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro. . No cromatograma do lado esquerdo usou-se clorofórmio/acetato de etilo 2:5 e no cromatograma do lado direito usou-se clorofórmio/acetato de etilo 5:2. Revelaram-se os cromatogramas com uma solução de Reagente de Folin-Ciocalteu.

É de referir que as zonas mais claras nos cromatogramas em que se usou o DPPH como revelador, coincidem com as zonas azuis que aparecem nos cromatogramas com o revelador reagente de Folin. Estes resultados permitem mostrar que muito provavelmente os compostos fenólicos estão relacionados com a atividade antioxidante destes extratos.

4.6 Determinação da Atividade Antimicrobiana

Vários estudos têm apresentado resultados que indicam que os compostos fenólicos exibem inúmeras atividades biológicas promotoras da saúde e podem ser usados como aditivos em alimentos para melhorar a sua estabilidade (Belkhir *et al.* 2013; Ganhão *et al.* 2010; Miguel *et al.* 2014). Também a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos tem sido documentada e havendo um crescente interesse em extratos de plantas que poderiam ser utilizados como alternativa aos atuais agentes antimicrobianos (Jurica *et al.* 2017).

4.6.1 Suscetibilidade bacteriana e fúngica dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro por ensaios de difusão em disco

A monitorização da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos brutos do medronheiro e do pirliteiro foi primeiro efetuada através da avaliação da suscetibilidade por difusão em disco. Considerando os resultados obtidos (Tabela 5), verificou-se que o extrato de medronheiro inibiu um maior número de espécies bacterianas do que o extrato de pirliteiro, acompanhado pela presença de halos de inibição de maior dimensão no caso do primeiro extrato. O extrato de pirliteiro apenas inibiu as espécies *B. cereus* e *K. pneumoniae* com obtenção de um halo de inibição de pequena dimensão. Em relação ao extrato do medronheiro, houve maior inibição nas espécies Gram positivas, tendo-se obtido o maior halo de inibição para a espécie *S. aureus* com $12,9 \pm 2,1$ mm. Estes resultados podem estar relacionados com o facto de existirem diferenças nas bactérias gram-positivas e gram-negativas. (Sassi *et al.* 2007).

Em relação às leveduras (Tabela 5), na espécie *C. tropicalis* visualizou-se halo de inibição nos dois extratos com $6,3 \pm 0,5$ mm, não se observando, no entanto, a formação de halo de inibição para as restantes espécies em estudo.

Dado que os extratos foram dissolvidos em DMSO, nos ensaios realizados também se colocaram, como controlo da toxicidade do solvente, discos com DMSO, sendo que não se observou inibição do mesmo para nenhuma das espécies de bactérias e leveduras em estudo (halo de inibição igual a $6,0 \pm 0,0$ mm).

Tabela 5: Diâmetros dos halos de inibição dos extratos metanólicos em espécies de bactérias e de leveduras apresentados como média \pm desvio padrão. Usaram-se discos com o diâmetro de 6 mm.

Diâmetro do halo de inibição (mm)			
Espécies		Medronheiro	Pirliteiro
Bactérias gram positivas	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12,9 \pm 2,1	6,0 \pm 0,0
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	10,1 \pm 1,0	7,5 \pm 0,5
	<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	10,1 \pm 4,0	6,0 \pm 0,0
Bactérias gram negativas	<i>E. coli</i> ATCC 25922	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	8,1 \pm 0,5	6,3 \pm 0,5
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7,5 \pm 2,1	6,0 \pm 0,0
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
	<i>A. baumannii</i> LMG 1025	6,6 \pm 0,6	6,0 \pm 0,0
Leveduras	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	6,3 \pm 0,5	6,3 \pm 0,5
	<i>C. glabrata</i> (Clinical strain)	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
	<i>C. lusitaniae</i> (Clinical strain)	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0

Resultados obtidos da atividade antimicrobiana do extrato de pirliteiro contra bactérias, das mesmas espécies e estirpes usadas no presente estudo, mostram que os extratos etanólicos dos frutos, com concentração diferente da usada neste estudo, inibem o crescimento de *S. aureus* (8 mm), *E. coli* (11 mm) e *P. aeruginosa* (13 mm) (Tadić *et al.* 2008). No entanto, Ignat *et al.* (2013) em extratos etanólicos dos frutos obtiveram inibição em *S. aureus* (15 mm) e com as espécies *E. coli* e *P. aeruginosa* tal não ocorreu. Nesse estudo também se analisaram extratos aquosos e para as três espécies houve crescimento, ao contrário do que se verificou com o extrato etanólico para *S. aureus*. Os extratos de folhas obtidos com acetona 80 % em 0,2 % ácido fórmico, inibiram o crescimento de *S. aureus*, no entanto, *E. coli* cresceu em todas as concentrações testadas de extrato (Denev *et al.* 2014). O extrato etanólico também inibiu o crescimento de uma estirpe de *C. albicans*, diferente das estudadas neste trabalho, obtendo-se um halo de inibição igual a 11 mm (Tadić *et al.* 2008).

Nos extratos de medronheiro também se verificam algumas diferenças quando se comparam resultados entre diferentes estudos. Em extratos metanólicos obtidos das folhas podem-se observar resultados de inibição de crescimento de *S. aureus* (19 mm) e *E. faecalis* (14 mm), mas não de *E. coli* e *P. aeruginosa* (Sassi *et al.* 2007). No entanto, num outro estudo já verificada inibição de *P. aeruginosa* (22 mm) e *E. faecalis* com um halo menor (8 mm) e na mesma, crescimento de *E. coli* (Jurica *et al.* 2017). Em relação às espécies *B. cereus* e *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, Ferreira *et al.* 2012 obtiveram resultados de

inibição semelhantes aos apresentados neste trabalho. Como se pode observar, nos extratos de folhas de medronheiro, podem encontrar-se diferenças nos resultados da atividade antimicrobiana tanto em extratos obtidos com o mesmo solvente como com solventes diferentes (Orak *et al.* 2011; Sassi *et al.* 2007). Estas variações também se verificam nas leveduras. Globalmente, não se obtiveram halos de inibição neste trabalho, com exceção de um halo reduzido para *C. tropicalis* ($6,3 \pm 0,5$ mm), mas foram detetados resultados com atividade antifúngica maior nesta espécie ($10,7 \pm 1,2$ e $12,0 \pm 2,6$ mm) em Ferreira *et al.* 2012. Nas restantes espécies estudadas, cresceram na presença do extrato de medronheiro.

Assim, podemos observar que os diferentes solventes usados para a extração, tal como as diferentes partes da planta, levam a resultados diferentes. Estas variações podem ser explicadas, dado que diferentes solventes vão extrair diferentes compostos da mesma amostra dependendo da sua polaridade, as partes da planta possuem diferenças nos conteúdos bioquímicos qualitativos e quantitativos (Belkhir *et al.* 2013) e do mesmo modo, o local de colheita e stresses aos quais as plantas foram sujeitas, também influenciam os resultados (Sassi *et al.* 2007).

4.6.2 Suscetibilidade bacteriana dos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respetivas frações por ensaios determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O segundo teste de monitorização da atividade antimicrobiana foi o método de microdiluição em meio líquido que permitiu a determinação da concentração mínima inibitória (Belkhir *et al.* 2013) para cada extrato bruto (M e P) e para as respetivas frações (F1, F2, F3 e F4) do medronheiro e do pirliteiro.

Segundo Okusa e seus colaboradores (2007), os extratos que possuam uma concentração inibitória inferior a 0,5 mg/ml são considerados dignos de investigação, se estiver entre 0,5 e 1 mg/ml, considera-se atividade antimicrobiana fraca e acima de 1 mg/ml, o extrato é inativo (Okusa *et al.* 2007). Considerando isto, de um modo geral, os resultados obtidos não demonstraram uma atividade bacteriana relevante para os extratos brutos e frações analisadas tendo em conta que as concentrações mínimas inibitórias obtidas foram entre 1 e > 2 mg/mL (Tabela 6). No entanto, verificou-se que o extrato de medronheiro possui maior poder antibacteriano que o extrato de pirliteiro. Enquanto que para o pirliteiro, apenas as frações 1 e 2 inibiram o crescimento de duas espécies bacterianas, as frações e extrato bruto do medronheiro inibiram maior número de espécies bacterianas. O menor valor de CMI obtido foi de 1 mg/mL para as frações e extrato bruto de medronheiro nas espécies *S. aureus* e *K. pneumoniae*, e o crescimento da espécie *B. cereus* foi inibido por todos os extratos do medronheiro (2 mg/mL). Também com esta concentração, o extrato bruto e as

frações 2 e 3 do medronheiro, inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*. Nas outras espécies de bactérias, a concentração mínima inibitória foi sempre superior a 2 mg/mL.

Tabela 6: Concentração mínima inibitória dos extratos metanólicos brutos e respetivas frações para as bactérias em estudo.

CMI (mg/mL)										
Espécies	M	F1M	F2M	F3M	F4M	P	F1P	F2P	F3P	F4P
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	1	1	1	2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	2	2	2	2	2	> 2	1	2	> 2	> 2
<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1	2	1	1	2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2	> 2	2	2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>A. baumannii</i> LMG 1025	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	1	> 2	> 2	> 2

Também neste método os extratos usados foram dissolvidos em DMSO, assim usou-se novamente o DMSO como controlo da toxicidade para as espécies, verificando-se que a concentração máxima testada não inibiu o crescimento bacteriano.

Em resultados reportados por outros autores, os extratos metanólicos das folhas de medronheiro não inibiram o crescimento das espécies *S. Typhimurium* (Ferreira *et al.* 2012) e *E. coli* (Ferreira *et al.* 2012, Jurica *et al.* 2017). Já para *E. faecalis*, estes extratos têm apresentado valores de CMI de 1,25 mg/mL (Sassi *et al.* 2007) ou > 2,5 mg/mL (Ferreira *et al.* 2012, Jurica *et al.* 2017). Esta diferença de resultados também se pode verificar para as espécies *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Ferreira *et al.* 2012, Sassi *et al.* 2007, Jurica *et al.* 2017). Comparando os extratos metanólicos com extratos aquosos, os resultados obtidos para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus* são ligeiramente diferentes aos nossos, mas essa diferença pode estar associada ao diferente solvente usado, visto que cada solvente extrai compostos bioativos diferentes (Jurica *et al.* 2017). Ainda assim, globalmente nota-se que há maior inibição nas bactérias gram positivas do que nas gram negativas.

De facto, a membrana externa das bactérias Gram negativas é conhecida por apresentar uma barreira à penetração de extratos polifenólicos (Belkhir *et al.* 2013). A resistência destas bactérias em relação a substâncias antibacterianas é usualmente devida à membrana fosfolipídica externa, tornando impermeável aos solutos lipofílicos, e às porinas que constituem uma barreira seletiva aos solutos hidrofílicos (Orak *et al.* 2011). Além disso, possuem o espaço periplasmático que contém enzimas capazes de destruir algumas moléculas estranhas introduzidas a partir do exterior (Belkhir *et al.* 2013).

Os extratos etanólicos obtidos a partir dos frutos de pirliteiro, estudados por outros autores, demonstraram uma atividade antibacteriana mais forte que os extratos metanólicos de folhas deste estudo em algumas estirpes iguais às testadas neste trabalho (Tadić *et al.* 2008), indicando que também nos extratos desta planta, ocorre diferenças associadas ao tipo de solvente e à parte da planta usados. Do mesmo modo, os extratos de folhas obtidos com diferentes solventes obtiveram concentrações inibitórias mais baixas que os metanólicos nas espécies *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Belkhir *et al.* 2013).

Diversos autores também chegaram à conclusão que este método, ao ser realizado em um meio líquido, toda a população bacteriana está em contato contínuo e homogêneo com os compostos a testar, facilitando assim os seus efeitos antimicrobianos. Além disso, fazendo o teste em placas de microdiluição, as concentrações fenólicas mais elevadas também podem ser um fator limitante uma vez que leva ao aparecimento de material precipitado na solução, afetando assim a quantificação e, conseqüentemente, a estimativa das concentrações inibitórias exatas (Belkhir *et al.* 2013).

Comparando os dois métodos de monitorização da atividade antimicrobiana neste trabalho, podemos afirmar que os resultados estão de acordo nos dois métodos, com exceção do observado para a espécie *L. monocytogenes*, para o extrato de medronheiro, uma vez que na difusão em disco houve um halo de inibição igual a $10,1 \pm 4,0$ mm e a concentração mínima inibitória determinada foi superior a 2 mg/mL em todos os extratos do medronheiro testados.

4.6.3 Suscetibilidade de leveduras aos extratos brutos do medronheiro e pirliteiro e respectivas frações por ensaios determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A determinação da concentração mínima inibitória realizada para a monitorização da atividade antimicrobiana dos extratos, também foi efetuada em espécies de leveduras (Tabela 7). Pelos resultados obtidos verifica-se que as frações 1, 2 e 4 do extrato de pirliteiro inibiram o crescimento das espécies *C. tropicalis* e do isolado clínico *C. lusitaniae* com concentrações mínimas inibitórias entre 0,063 e 0,500 mg/mL, sendo que o valor mais baixo de CMI foi verificado na fração 1 para *C. tropicalis*. O extrato bruto apenas inibiu *C. tropicalis* com uma CMI de 0,500 mg/mL, sendo que para as restantes *Candida spp* a CMI determinada foi maior que 2 mg/mL. Tendo em conta os resultados para *C. lusitaniae*, apesar de não se conhecer a constituição exata de cada fração e extrato bruto, verificou-se que estes extratos apresentam potencial antimicrobiano diferente. O fracionamento com solventes de polaridades, faz com que os compostos retirados do extrato bruto sejam diferentes em cada fração, assim indicando que os compostos obtidos nas diferentes frações possam ter um efeito

antagonista levando a uma perda de atividade do extrato bruto, na gama de concentrações testada.

No caso do medronheiro, as frações 1 e 2 inibiram *C. albicans* ATCC 90028 e a fração 4 inibiu as duas estirpes de *C. albicans* com valores de CMI entre 1 e 2 mg/mL. Para as espécies *C. tropicalis* e *C. lusitanae*, todos os extratos de medronheiro demonstraram efeito antifúngico com valores de CMI entre 0,008 e 0,500 mg/ml, com foco no isolado clínico *C. lusitanae*. Estes resultados são bastante promissores uma vez que existem estirpes destas espécies que são resistentes a antifúngicos (Kothavade *et al.* 2010; Asner *et al.* 2015) e assim, poderia ser uma mais valia estudar estes extratos no desenvolvimento de novos antifúngicos ou para potenciar o efeito dos já existentes.

Relativamente à espécie *C. glabrata*, nenhum dos extratos do medronheiro inibiu o seu crescimento no intervalo de concentrações testado, por isso considera-se que os extratos são inativos para esta levedura.

Tabela 7: Concentração mínima inibitória dos extratos metanólicos brutos e das respetivas frações para leveduras.

CMI (mg/mL)										
Espécies	M	F1M	F2M	F3M	F4M	P	F1P	F2P	F3P	F4P
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	> 2	2	1	> 2	1	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	> 2	> 2	> 2	> 2	2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,125	0,250	0,125	0,500	0,125	0,500	0,063	0,125	> 2	0,500
<i>C. glabrata</i> clínica	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>C. lusitanae</i> clínica	0,008	0,031	0,031	0,008	0,008	> 2	0,250	0,500	> 2	0,250

Nos ensaios com as leveduras, os extratos usados também foram dissolvidos em DMSO. Esta solução foi novamente usada como controlo da toxicidade, sendo que não interferiu com crescimento de nenhuma das leveduras em estudo.

Segundo a pesquisa bibliográfica realizada, não foram encontrados muito estudos com estes extratos contra espécies de leveduras. Para o extrato metanólico de folhas de medronheiro, em Jurica *et al.* (2017), testaram a estirpe *C. albicans* ATCC 10231 e o isolado clínico *C. albicans* 39620 e este extrato não inibiu o crescimento destas estirpes. Os resultados obtidos para *C. albicans* mostraram um efeito inibitório fraco de extratos de folhas de medronheiro, que está em correlação com o estudo de Jurica *et al.* (2017).

O extrato etanólico de frutos de pirliteiro, inibiu o crescimento da espécie *C. albicans* ATCC 10231 com um valor de CMI igual a 0,119 mg/mL (Tadić *et al.* 2008). Neste caso, existe uma diferença relevante visto que os extratos metanólicos das folhas não inibiram o crescimento das estirpes de *C. albicans*. Os resultados apresentados em estudos anteriores e no presente trabalho indicam que os frutos do pirliteiro podem ter mais propriedades antimicrobianas quando comparado com as observadas para as suas folhas.

Comparando os dois métodos de monitorização da atividade antimicrobiana, no caso das leveduras, principalmente para a espécie *C. lusitaniae*, a concentração mínima inibitória verificada foi de 0,008 mg/mL, no entanto, no método de difusão em disco não surgiu nenhum halo de inibição. Isto pode ser relacionado com o facto de a concentração de extrato usada nos ensaios ter sido de 100 mg/mL e por ser uma concentração elevada, o extrato pode não ter impregnado o suficiente nos discos impedindo assim a dispersão normal do extrato pelo agar. Além de que, no teste de difusão em disco, a limitação da cinética de difusão dos compostos nos discos e a presença local de pequenos números bacterianos em contato com os compostos a testar, devido à falta de uniformidade do inóculo, podem ser fatores importantes que levam à incoerência do potencial real dos extratos (Belkhir *et al.* 2013).

4.6.4 Bioautografia

De modo a verificar a atividade antimicrobiana dos extratos de forma qualitativa, procedeu-se à realização de uma autografiografia usando o MTT como indicador da viabilidade celular. As espécies selecionadas para este ensaio foram as que demonstraram melhores resultados no método da determinação da concentração mínima inibitória e assim, testaram-se três espécies de leveduras (*C. albicans* ATCC 900028, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*). Em paralelo a cada ensaio, fez-se um cromatograma com Anfotericina B de modo a servir de controlo para a interpretação dos resultados. É possível ver que em todos os cromatogramas controlo, até onde a Anfotericina B migrou, não existe crescimento de microrganismos e por isso essa zona denota cor amarela. A cor amarela significa que não houve redução mitocondrial do MTT a formazano, ou seja, os microrganismos não estavam viáveis (Nunes *et al.* 2016).

Nos ensaios para a espécie *C. albicans*, a inibição do crescimento, zonas que estão com cor amarela, é mais visível nos extratos de medronheiro, principalmente na fração 1, 2 e 3. No cromatograma do pirliteiro, a zona da fração 4 é onde se encontra maior crescimento da espécie (Figura 30). Os resultados obtidos nos ensaios de determinação da concentração mínima inibitória, no caso do pirliteiro, o CMI foi > 2 mg/mL para todos os extratos testados, enquanto que para o medronheiro, as frações mais ativas foram a 1, 2 e 4 com CMI entre 1 e 2 mg/mL. Comparando estes dois métodos, chegamos à conclusão que os resultados não estão concordantes.

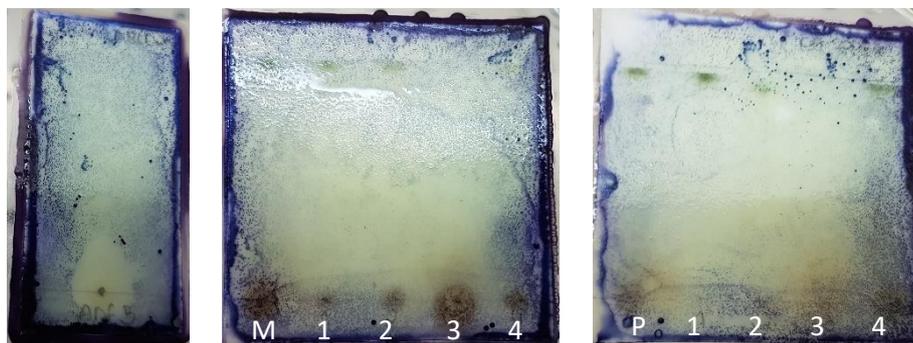


Figura 30: Bioautografia da anfotericina B (esquerda), do extrato bruto metanólico e respectivas frações do medronheiro (centro) e do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro (direita) para a espécie *Candida albicans* ATCC 90028.

Para a espécie *C. tropicalis*, pelos cromatogramas da Figura 31, pode verificar-se que no medronheiro a fração 1 e 3 inibem mais o crescimento e no cromatograma do pirliteiro a fração 3 é que aparenta ter menos cristais de formazano. Nos extratos de medronheiro, para o extrato bruto e para as frações 2 e 4 determinou-se uma CMI de 0,125 mg/mL, sendo estes os extratos com maior atividade antifúngica. A fração 3 do pirliteiro, foi o único extrato que deu CMI > 2 mg/mL para esta espécie. Podemos verificar que mais uma vez os resultados não coincidem.

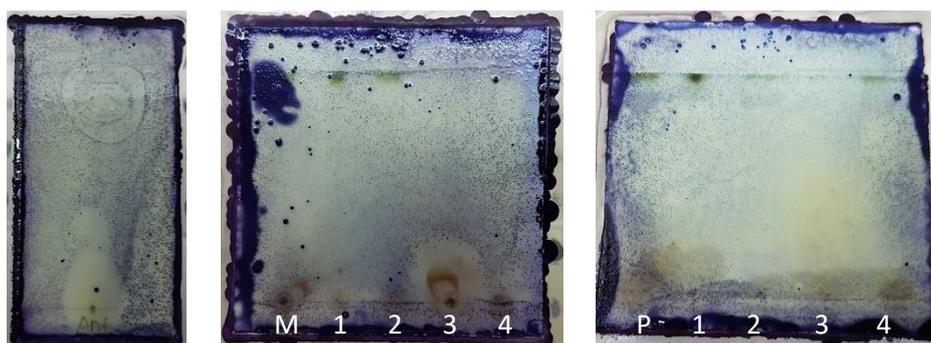


Figura 31: Bioautografia da anfotericina B (esquerda), do extrato bruto metanólico e respectivas frações do medronheiro (centro) e do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro (direita) para a espécie *Candida tropicalis* ATCC 750.

Para a espécie *C. lusitaniae*, na Figura 32, é evidente que os extratos de medronheiro têm elevada atividade antifúngica, dado que o cromatograma encontra-se todo a amarelo sem se observar indícios de atividade metabólica de *C. lusitaniae*. As CMI obtidas nos extratos

de medronheiro situam-se entre 0,008 e 0,031 mg/mL e pode-se verificar na bioautografia que esses extratos têm atividade antifúngica forte. O cromatograma do pirliteiro não está tão nítido, mas percebe-se que há zonas com mais crescimento do que outras, como se pode confirmar pelos resultados de CMI, em que existem frações com atividade (fração 1, 2 e 4) e outras sem atividade (extrato bruto e fração 3).

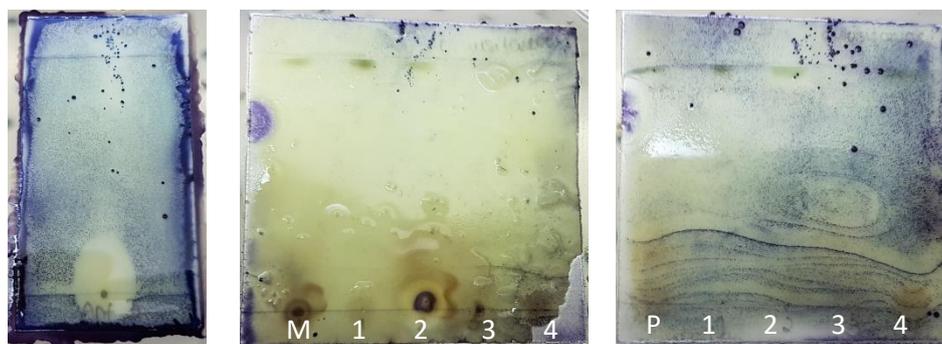


Figura 32: Bioautografia da anfotericina B (esquerda), do extrato bruto metanólico e respectivas frações do medronheiro (centro) e do extrato bruto e respectivas frações do pirliteiro (direita) para a espécie *Candida lusitanae*.

Alguns resultados obtidos na bioautografia deste trabalho não estão em concordância com os resultados anteriormente obtidos. A principal vantagem deste tipo de bioautografia, é que todas as etapas deste método, tais como separação, pré-condicionamento, incubação e visualização, são realizadas diretamente na placa de TLC (Grzelak *et al.* 2011).

No entanto, existem diversas condições que influenciam os resultados, como os microrganismos testados, a fase móvel, a composição do meio, o pH e a solubilidade da amostra podem interferir na detecção bioautográfica (Choma e Grzelak, 2011). A viscosidade do meio também é essencial para a detecção bioautográfica uma vez que, se o meio for muito fluido, pode não aderir corretamente na superfície da placa de TLC, resultando em zonas de inibição pouco claras. Se a viscosidade for muito alta, dificulta a cobertura das placas de TLC fazendo com que o inóculo não fique uniforme na placa (Grzelak *et al.* 2011). Do mesmo modo, o tempo de incubação inadequado das placas de TLC resulta em zonas de inibição que não são bem definidas visto que a concentração de microrganismos é baixa (tempo muito curto) ou excesso de crescimento nestas zonas (tempo muito longo) (Grzelak *et al.* 2013). Outros fatores que influenciam os resultados pode ser o caráter químico do adsorvente, os microrganismos crescem diretamente na superfície da placa de TLC e por esta razão a superfície da TLC tem um papel crucial no crescimento de bactérias (Grzelak *et al.* 2013).

Assim, futuramente, deve-se alterar as condições do método de modo a perceber o que é que estava a influenciar os resultados de modo a ficarem concordantes com os resultados obtidos nos ensaios de monitorização realizados para a atividade antimicrobiana.

4.6.5 Estudo do efeito combinado dos extratos com o antifúngico Anfotericina B

A necessidade de desenvolver alternativas aos antibióticos existentes é essencial nos dias de hoje, pois cada vez mais se verificam resistências dos microrganismos aos medicamentos existentes (Mohan *et al.* 2013). Certos produtos naturais de plantas, como é o caso dos compostos fenólicos, são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas (Dib *et al.* 2013). Assim, o estudo da combinação de extratos de plantas com antibióticos já existentes, pode ser uma nova terapia para combater os microrganismos patogênicos (Sassi *et al.* 2007).

De modo a aprofundar o conhecimento do efeito antimicrobiano dos extratos de medronheiro e de pirliteiro, procedeu-se à realização de um teste de sinergismo com o antifúngico Anfotericina B e os extratos brutos e frações que apresentaram melhor atividade anti-*Candida* nos ensaios anteriores.

Os extratos bruto e frações mais ativas de medronheiro foram assim testados sobre as três espécies de leveduras que demonstraram maior suscetibilidade (*C. albicans* ATCC 900028, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. lusitaniae* isolado de origem clínica) (Tabela 8). Todos os extratos testados para *C. tropicalis*, apresentam efeito sinérgico com a Anfotericina B. O extrato bruto e frações 3 e 4 em *C. lusitaniae*, a fração 1 e o extrato bruto testados em *C. albicans* demonstram uma interação aditiva com o antifúngico e apenas as frações 2 e 4 em *C. albicans* não têm interação com o antifúngico. Novamente, percebe-se que as frações possuem constituição diferente, tendo em conta que para *C. albicans* a fração 1 apresenta um efeito aditivo não observado nas frações 2 e 4, indicando que a atividade observada para o extrato bruto se pode dever à constituição da fração 1. Para as restantes espécies, todas as frações testadas demonstram interação aditiva ou sinérgica.

Tabela 8: Valores obtidos para o Índice de concentração inibitória fracionada e o respetivo efeito dos extratos de medronheiro juntamente com o antifúngico Anfotericina B.

Medronheiro			
Espécie	Fração	FICI	Efeito
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	M	≤ 0,52	Aditivo
	1	≤ 0,53	Aditivo
	2	≤ 1,02	Indiferente
	4	≤ 1,03	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	M	≤ 0,31	Sinérgico
	2	≤ 0,25	Sinérgico
	4	≤ 0,25	Sinérgico
<i>C. lusitaniae</i> clínica	M	≤ 1,00	Aditivo
	3	≤ 0,75	Aditivo
	4	≤ 0,75	Aditivo

Em relação aos extratos de pirliteiro (Tabela 9), o extrato bruto demonstrou um efeito sinérgico na presença do antifúngico Anfotericina B nas duas espécies testadas. Para *C. tropicalis*, a fração 1 teve um efeito aditivo e a fração 2 não mostrou interação com este antifúngico. Para *C. lusitaniae* as duas frações testadas apresentam efeito aditivo. Uma possível explicação para que o extrato bruto tenha um efeito sinérgico e as frações não, é que os compostos presentes nas frações, quando se encontram juntos, interagem e potenciam o efeito desse extrato enquanto que separados apenas demonstrem um efeito aditivo com o antifúngico. Para se poder comprovar esta teoria, seria necessário conhecer a constituição exata de cada extrato e realizar testes de suscetibilidade com os compostos isolados, seguidos de avaliação de sinergismo com combinações dos mesmos.

Tabela 9: Valores obtidos para o Índice de concentração inibitória fracionada e o respetivo efeito dos extratos de pirliteiro juntamente com o antifúngico Anfotericina B.

Pirliteiro			
Espécie	Fração	FICI	Efeito
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	P	≤ 0,38	Sinérgico
	1	≤ 1,00	Aditivo
	2	≤ 1,03	Indiferente
<i>C. lusitaniae</i> clínica	P	≤ 0,48	Sinérgico
	1	≤ 0,72	Aditivo
	4	≤ 0,75	Aditivo

Apenas foi encontrado um estudo de sinergismo com o medronheiro e pode-se observar que foi testado um possível efeito combinado entre o extrato metanólico obtido a partir das folhas do medronheiro com os antibióticos cefotaxima e estreptomicina. No entanto, os resultados obtidos não foram promissores visto que para a espécie *P. aeruginosa* ATCC 9027 e no isolado clínico *S. aureus* C 100459 resistente à meticilina, os extratos demonstraram um efeito indiferente (FICI entre 1 e 4) na presença destes antibióticos (Guendouze-Bouchefa *et al.* 2015).

Capítulo 5. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades bioativas de extratos metanólicos das folhas de medronheiro e de pirliteiro, especificamente a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana.

Assim, verificou-se através dos resultados obtidos que o extrato de medronheiro possui mais compostos fenólicos, enquanto que o extrato de pirliteiro possui mais flavonoides.

Com a análise do método de DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linoleico para a determinação da atividade antioxidante, pode-se concluir que os dois métodos são concordantes nos resultados obtidos para estes extratos, ou seja, o extrato de medronheiro apresenta maior atividade antioxidante que o extrato de pirliteiro. Em relação aos padrões usados (rutina, trolox e ácido gálico para o DPPH e o BHT para o β -caroteno), tanto num método como no outro, os extratos possuem atividade antioxidante mais fraca que estes. É de referir que o extrato de medronheiro é o que possui mais compostos fenólicos e maior atividade antioxidante, o que poderá estar de acordo com o facto de os compostos fenólicos estarem envolvidos na atividade antioxidante, como é referido na literatura.

Em relação à atividade antimicrobiana dos extratos, procedeu-se à avaliação da suscetibilidade de nove espécies de bactérias, entre as quais gram positivas e gram negativas, e quatro espécies de leveduras aos extratos de medronheiro e pirliteiro. Pode-se observar que, no que diz respeito às bactérias, ambos os extratos se podem considerados inativos quanto à sua atividade antibacteriana, pois possuem valores de CMI maiores ou iguais a 1 mg/mL. No entanto, apresentam atividade antimicrobiana para leveduras, nomeadamente *C. tropicalis* e *C. lusitaniae* no intervalo de CMI de 0,008 - 0,5 mg/mL, sendo a maior atividade verificada no extrato bruto de medronheiro e nas frações 3 e 4 deste, na espécie *C. lusitaniae*. Relativamente ao estudo do efeito combinado dos extratos brutos metanólicos ou das frações do medronheiro e do pirliteiro com a anfotericina B, foram observados resultados promissores nas espécies *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*, visto que os extratos testados mostraram um efeito aditivo ou mesmo sinérgico com o antifúngico. Assim, este trabalho veio salientar o potencial antimicrobiano dos extratos de plantas, com ênfase, na atividade obtida *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*. A relevância destes resultados é salientada, uma vez que estas duas espécies de levedura já revelaram conseguir provocar infeções graves, e inclusive, apresentando estirpes resistentes a certos antifúngicos.

Assim, podemos afirmar que o extrato de medronheiro, de forma geral, denota melhores resultados que o extrato de pirliteiro, com ênfase no seu efeito antifúngico.

Este estudo permitiu contribuir para a avaliação global de produtos naturais bioativos e os resultados obtidos podem ser benéficos para o desenvolvimento de extratos para aplicação farmacêutica, a fim de prevenir e tratar doenças e melhorar a saúde dos pacientes ou como suplementos alimentares devido às propriedades antioxidantes.

No futuro, seria importante estudar este tipo de extrato de modo a caracterizar fitoquimicamente a sua constituição a fim de saber qual ou quais os compostos com atividades biológicas e posteriormente isolar e identificar os compostos puros usando ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa para seguidamente conhecer melhor o seu mecanismo de ação nas respetivas propriedades bioativas.

Capítulo 6. Referências Bibliográficas

- Abuashwashi MA, Palomino OM, Gómez-Serranillos MP. Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. *Pharm Biol.* 2016;54(11):2708-13.
- Ali L, Goraya MU, Arafat Y, Ajmal M, Chen JL, Yu D. Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: Its role in virulence and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):19.
- Arslan R, Bektas N, Bor Z, Sener E. Evaluation of the antithrombotic effects of *Crataegus monogyna* and *Crataegus davisii* in the carrageenan-induced tail thrombosis model. *Pharm Biol.* 2015;53(2):275-9.
- Asner SA, Giulieri S, Diezi M, Marchetti O, Sanglard D. Acquired multidrug antifungal resistance in *Candida lusitanae* during therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7715-22.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 2013;117(4):426-36.
- Barreira JCM, Rodrigues S, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Development of hydrosoluble gels with *Crataegus monogyna* extracts for topical application: Evaluation of antioxidant activity of the final formulations. *Ind Crops Prod.* 2013;42(1):175-80.
- Barros L, Carvalho AM, Morais JS, Ferreira ICFR. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* 2010;120(1):247-54.
- Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *J Food Meas Charact.* 2017;11(2):847-63.
- Belkhir M, Rebai O, Dhaouadi K, Congiu F, Ignazio C, Tuberoso G, et al. Comparative Analysis of Tunisian Wild *Crataegus azarolus* (Yellow Azarole) and *Crataegus monogyna* (Red Azarole) Leaf, Fruit, and Traditionally Derived Syrup: Phenolic Profiles and Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Aqueous-Acetone Extracts. 2013;61:9594-9601.

- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* 2009;56(11):317-33.
- Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control.* 2017;75:1-13.
- Chang W, Dao J, Shao Z. Hawthorn: Potential roles in cardiovascular disease. *Am J Chin Med.* 2005;33(1):1-10.
- Chen LY, Cheng CW, Liang JY. Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem.* 2015;170:10-5.
- Choma IM, Grzelak EM. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* 2011;1218(19):2684-91.
- CLSI, 2008. M44-A2, Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts.
- Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti MG. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *J Ethnopharmacol.* 2009;125(1):16-30.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Brazilian J Pharmacogn.* 2008;18:670-5.
- Dawidowicz AL, Olszowy M. Depletion/protection of β -carotene in estimating antioxidant activity by β -carotene bleaching assay. *J Food Sci Technol.* 2015;52(11):7321-8.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(14):1818-92.
- Delgado-Pelayo R, Gallardo-Guerrero L, Hornero-Méndez D. Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chem.* 2016;199:165-75.
- Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Blazheva D, et al. Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(2):359-67.
- Dib MEA, Allali H, Bendiabdellah A, Meliani N, Tabti B. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *J Saudi Chem Soc.* 2013;17(4):381-5.

- El Ouarti A, Haouat AC, Sqalli H, Haggoud A, Ennabili A, Ibsouda S, et al. Extra- and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo* L. African J Microbiol Res. 2012;6(6):1283-90.
- Elango C, Jayachandaran KS, Niranjali Devaraj S. Hawthorn extract reduces infarct volume and improves neurological score by reducing oxidative stress in rat brain following middle cerebral artery occlusion. Int J Dev Neurosci. 2009;27(8):799-803.
- Fàbrega A, Vila J. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):308-41.
- Ferreira S, Santos J, Duarte A, Duarte AP, Queiroz JA, Domingues FC. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. Nat Prod Res. 2012;26(16):1558-60.
- Fonseca DFS, Salvador ÂC, Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, Silvestre AJD, et al. Bioactive phytochemicals from wild *Arbutus unedo* L. Berries from different locations in Portugal: Quantification of lipophilic components. Int J Mol Sci. 2015;16(6):14194-209.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol. 2014;12:49-62.
- Ganhão R, Morcuende D, Estévez M. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. Meat Sci. 2010;85(3):402-9.
- Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM, Pilorz KM. Development of a novel direct bioautography-thin-layer chromatography test: Optimization of growth conditions for gram-positive bacteria, *Bacillus subtilis*. J AOAC Int. 2013;96(2):386-91.
- Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM. Development of a novel direct bioautography-thin-layer chromatography test: Optimization of growth conditions for gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. J AOAC Int. 2011;94(5):1567-72.
- Guendouze-Bouchefa N, Madani K, Chibane M, Boulekbache-Makhlouf L, Hauchard D, Kiendrebeogo M, et al. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three *Ericaceae* from Algeria. Ind Crops Prod. 2015;70:459-66.
- Guimarães R, Barros L, Calheta RC, Carvalho AM, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR. Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal: A Comparative Study. Plant Foods Hum Nutr. 2014;69(1):37-42.

- Guimarães R, Barros L, Maria A, João M, Queiroz RP, Santos-buelga C, et al. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem.* 2013;141:3721-30.
- Hinojosa-Nogueira D, Muros J, Rufián-Henares JA, Pastoriza S. New Method to Estimate Total Polyphenol Excretion: Comparison of Fast Blue BB versus Folin-Ciocalteu Performance in Urine. *J Agric Food Chem.* 2017;65(20):4216-22.
- Holubarsch CJF, Colucci WS, Meinertz T, Gaus W, Tendera M. Survival and prognosis: Investigation of *Crataegus* extract WS 1442 in congestive heart failure (SPICE) - Rationale, study design and study protocol. *Eur J Heart Fail.* 2000;2(4):431-7.
- Hoseinzadeh E, Makhdoumi P, Taha P, Hossini H, Pirsahab M, Omid Rastegar S, et al. A review of available techniques for determination of nano-antimicrobials activity. *Toxin Rev.* 2017;36(1):18-32.
- Ignat I, Radu DG, Volf I, Pag AI, POPA VI. Antioxidant and Antibacterial Activities of Some Natural Polyphenols. 2013;47:387-99.
- Jardim C, Macedo D, Figueira I, Dobson G, McDougall GJ, Stewart D, et al. (Poly)phenol metabolites from *Arbutus unedo* leaves protect yeast from oxidative injury by activation of antioxidant and protein clearance pathways. *J Funct Foods.* 2017;32:333-46.
- Jurica K, Gobin I, Kremer D, Čepo DV, Grubešić RJ, Karačonji IB, et al. Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J Herb Med.* 2017;8:17-23.
- Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol.* 2010;59(8):873-80.
- Li H, Gänzle M. Some like it hot: Heat resistance of *Escherichia coli* in food. *Front Microbiol.* 2016;7(11):1-12.
- Luís Â, Breitenfeld L, Ferreira S, Duarte AP, Domingues F. Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Hakea sericea* Schrader extracts. *Pharmacogn Mag.* 2014;10(37):9.
- Luís Â, Duarte AP, Pereira L, Domingues F. Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties. *Eur Food Res Technol.* 2017.

- Luís A, Neiva D, Pereira H, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. Stumps of *Eucalyptus globulus* as a source of antioxidant and antimicrobial polyphenols. *Molecules*. 2014;19(10):16428-46.
- Luís Â, Neiva DM, Pereira H, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. Bioassay-guided fractionation, GC-MS identification and in vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of bioactive compounds from *Eucalyptus globulus* stump wood methanolic extract. *Ind Crops Prod*. 2016;91(9):97-103.
- Magalhães LM, Almeida MIGS, Barreiros L, Reis S, Segundo MA. Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas. *Food Anal Methods*. 2012;5(3):530-9.
- Malheiro R, Sá O, Pereira E, Aguiar C, Baptista P, Pereira JA. *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Ind Crops Prod*. 2012;37(1):473-8.
- Mammen D, Daniel M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem*. 2012;135(3):1365-8.
- Marioni J, Arce JE, Cabrera JL, Paraje MG, Núñez Montoya SC. Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharm Biol*. 2016;54(12):2791-801.
- Mendes L, De Freitas V, Baptista P, Carvalho M. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(9):2285-91.
- Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties. *Molecules*. 2014;19(10):15799-823.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*. 2004;85(2):231-7.
- Mohan R, Mukherjee A, Sevgen SE, Sanpitakseree C, Lee J, Schroeder CM, et al. A multiplexed microfluidic platform for rapid antibiotic susceptibility testing. *Biosens Bioelectron*. 2013;49:118-25.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(Pt 4):1113.

- Morales P, Ferreira ICFR, Carvalho AM, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata MSOSCC, Cámara M, et al. Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2013;115(2):176-85.
- Morschhäuser J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol*. 2016;54(3):192-201.
- Mosele JI, Macià A, Motilva M-J. Understanding of human metabolic pathways of different sub-classes of phenols from *Arbutus unedo* fruit after an acute intake. *Food Funct*. 2016a;7(3):1700-10.
- Mosele JI, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation. *Food Chem*. 2016b;201:120-30.
- Moualek I, Iratni Aiche G, Mestar Guechaoui N, Lahcene S, Houali K. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016;6(11):937-44.
- Nabavi SF, Habtemariam S, Ahmed T, Sureda A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, et al. Polyphenolic composition of *Crataegus monogyna* jacq.: From chemistry to medical applications. *Nutrients*. 2015;7(9):7708-28.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, Pennsylvania, 2002.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, Pennsylvania, 2003a.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, Pennsylvania, 2003b.
- Nenadis N, Llorens L, Koufogianni A, Díaz L, Font J, Gonzalez JA, et al. Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015;153:435-44.

- Nunes R, Pasko P, Tyszka-Czochara M, Szewczyk A, Szlosarczyk M, Carvalho IS. Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. *Pharm Biol.* 2017;55(1):114-23.
- Okusa PN, Penge O, Devleeschouwer M, Duez P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (*Boraginaceae*). *J Ethnopharmacol.* 2007;112(3):476-81.
- Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA. *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *J Food Nutr Res.* 2011;50(2):73-85.
- Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(7):1507-11.
- Orak HH, Yagar H, Isbilir SS, Demirci AŞ, Gümüş T, Ekinci N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) leaf. *Food Sci Biotechnol.* 2011;20(5):1249-56.
- Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol.* 2014;17(1):32-7.
- Parekh J, Jadeja D, Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Methods.* 2005;29:203-10.
- Pliszka B, Huszcza-Ciołkowska G, Wierzbicka E. Effects of solvents and extraction methods on the content and antiradical activity of polyphenols from fruits *Actinidia arguta*, *Crataegus monogyna*, *Gaultheria procumbens* and *Schisandra chinensis*. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2016;15(1):57-63.
- Qi G, Yang L, Xiao C, Shi J, Mi Y, Liu X. Nutrient values and bioactivities of the extracts from three fern species in China: a comparative assessment. *Food Funct.* 2015;6(9):2918-29.
- Roudashti S, Zeighami H, Mirshahabi H, Bahari S, Soltani A, Haghi F. Synergistic activity of sub-inhibitory concentrations of curcumin with ceftazidime and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing related genes and virulence traits. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(3):1-8.
- Sassi A Ben, Harzallah-Skhiri F, Aouni M. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharm Biol.* 2007;45(5):421-8.
- Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 2009;112(3):654-8.

- Shai LJ, McGaw LJ, Aderogba MA, Mdee LK, Eloff JN. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J Ethnopharmacol.* 2008;119(2):238-44.
- Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 2009;113(4):1202-5.
- Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP. Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* 2014;98(4):828-34.
- Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendona DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine.* 2011;19(1):42-7.
- Silva O, Viegas S, De Mello-Sampayo C, Costa MJP, Serrano R, Cabrita J, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Terminalia macroptera* root. *Fitoterapia.* 2012;83(5):872-6.
- Simirgiotis MJ. Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of chilean peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with german peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules.* 2013;18(2):2061-80.
- Simsek M, Duman R. Investigation of effect of 1,8-cineole on antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate. *Pharmacognosy Res.* 2017;9(3):234.
- Soltani R, Fazeli H, Najafi RB, Jelokhanian A. Evaluation of the synergistic effect of tomatidine with several antibiotics against standard and clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Iran J Pharm Res.* 2017;16(1):290-6.
- Tadić VM, Dobrić S, Marković GM, Đorđević SM, Arsić IA, Menković NR, Stević T. Anti-inflammatory, Gastroprotective, Free-Radical-Scavenging, and Antimicrobial Activities of Hawthorn Berries Ethanol Extract. *J Agric Food Chem.* 2008;7700-9.
- Turker AU, Yildirim AB, Karakas FP. Antibacterial and Antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2012;26(1):2765-72.
- Ueno H, Yamakura S, Arastoo RS, Oshima T, Kokubo K. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullererenols using β -Carotene bleaching assay. *J Nanomater.* 2014;2014(Figure 1).

Wiederhold NP. Echinocandin Resistance in *Candida* Species: a Review of Recent Developments. *Curr Infect Dis Rep.* 2016;18(12).

Yang YL, Wang AH, Wang CW, Cheng WT, Li SY, Lo HJ. Susceptibilities to Amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts 2006. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61(2):175-80.

Zhang Z, Chang Q, Zhu M, Huang Y, Ho WKK, Chen ZY. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *J Nutr Biochem.* 2001;12(3):144-52.

Anexo I

Determinação da Atividade antioxidante (Método do DPPH)

No ponto 4.4.1 do capítulo dos Resultados e Discussão, a determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi demonstrada através do extrato de medronheiro. Os seguintes gráficos e tabelas dizem respeito ao extrato de pirliteiro e aos padrões rutina, trolox e ácido gálico.

Extrato de pirliteiro

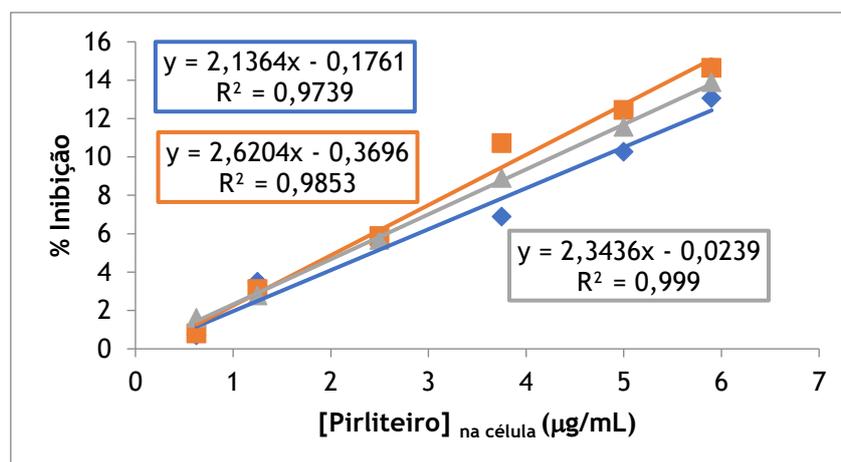


Figura 33: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no extrato de pirliteiro.

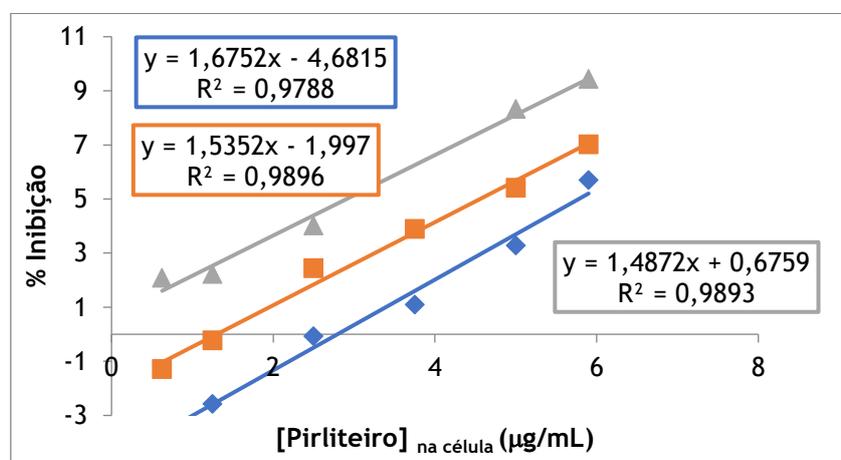


Figura 34: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no extrato de pirliteiro.

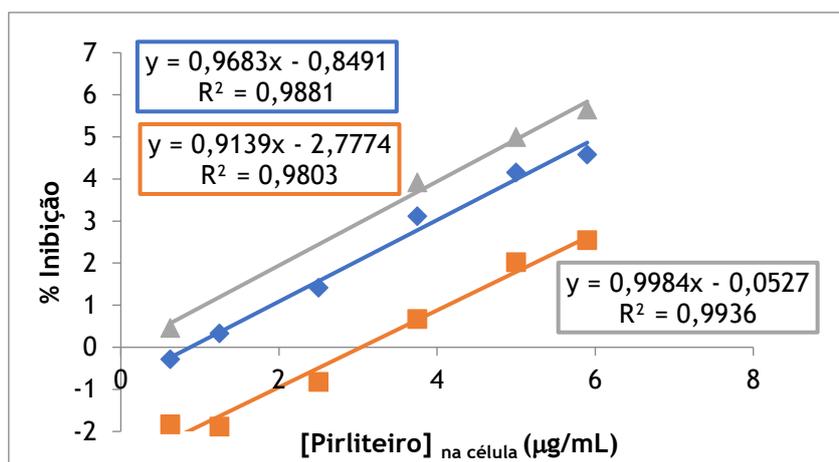


Figura 35: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no extrato de pirliteiro.

Tabela 10: Valor obtido de IC₅₀ para o extrato de pirliteiro através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.

Extrato de pirliteiro		
[DPPH] = 0,080 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	23,486	21,351 ± 2,132
2	19,222	
3	21,345	
[DPPH] = 0,124 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	32,642	33,226 ± 0,616
2	33,870	
3	33,166	
[DPPH] = 0,200 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	52,514	53,465 ± 3,897
2	57,750	
3	50,133	
Média total ± Desvio médio IC ₅₀		
36,014 ± 11,634		

Padrão Rutina

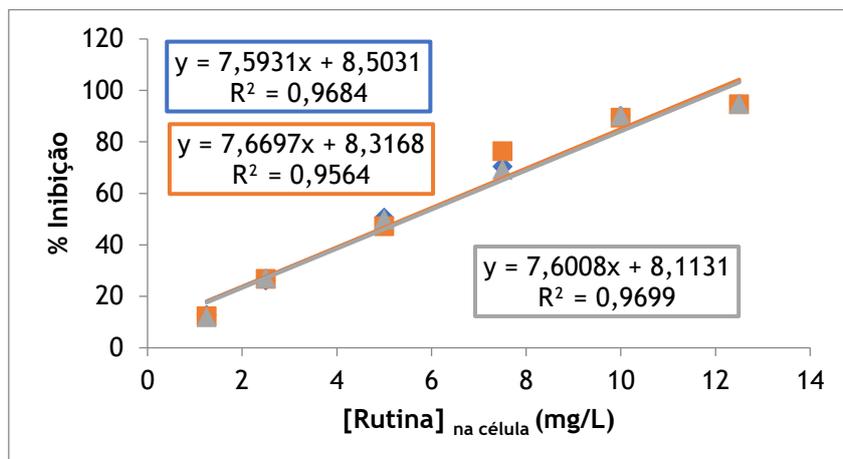


Figura 36: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no padrão rutina.

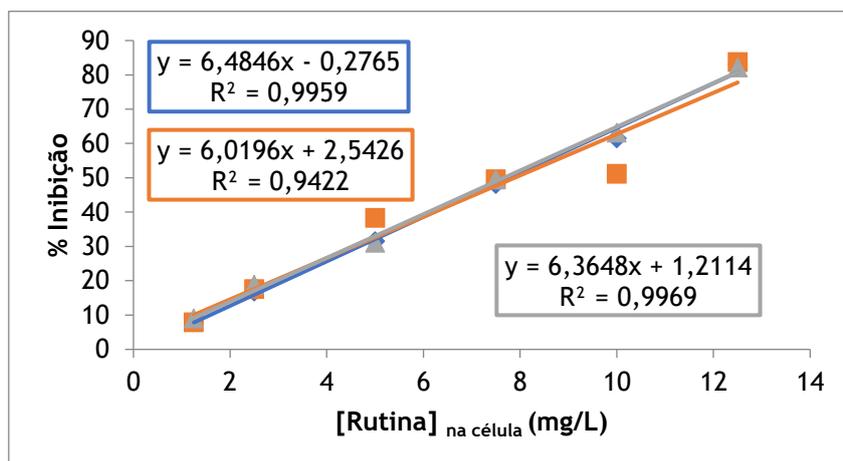


Figura 37: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no padrão rutina.

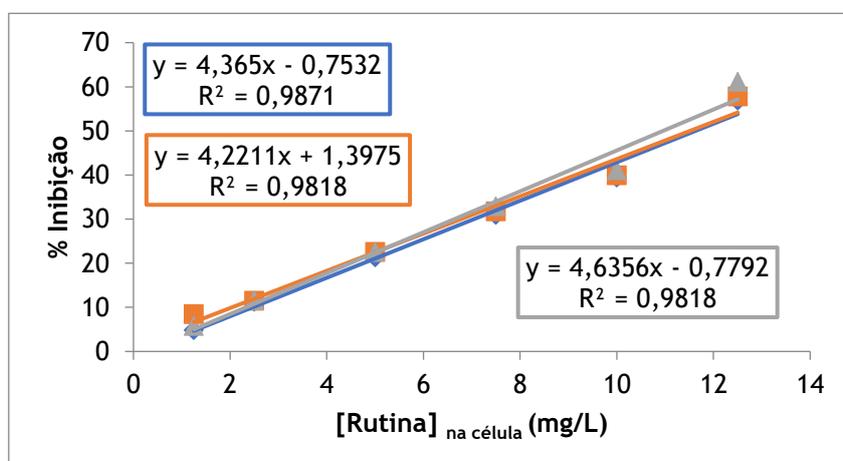


Figura 38: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no padrão rutina.

Tabela 11: Valor obtido de IC₅₀ para o padrão rutina através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.

Rutina		
[DPPH] = 0,080 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	5,465	5,470 ± 0,038
2	5,435	
3	5,511	
[DPPH] = 0,124 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	7,753	7,767 ± 0,110
2	7,884	
3	7,665	
[DPPH] = 0,200 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	11,627	11,365 ± 0,360
2	11,514	
3	10,954	
Média total ± Desvio médio IC ₅₀		
8,201 ± 2,109		

Padrão Trolox

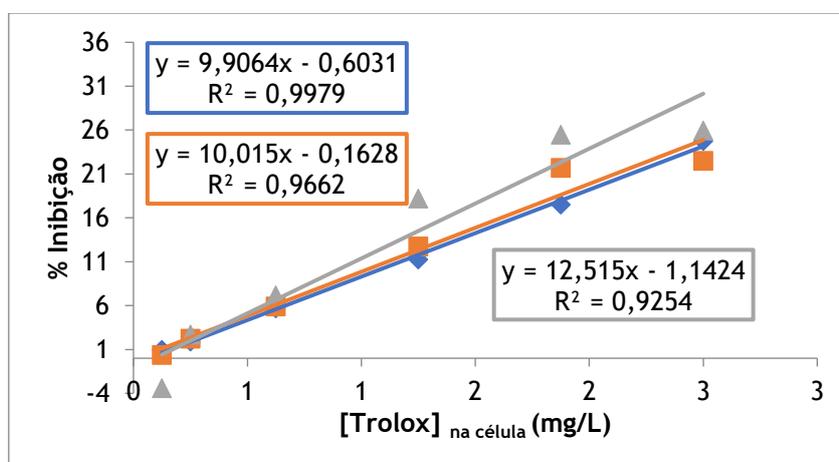


Figura 39: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no padrão trolox.

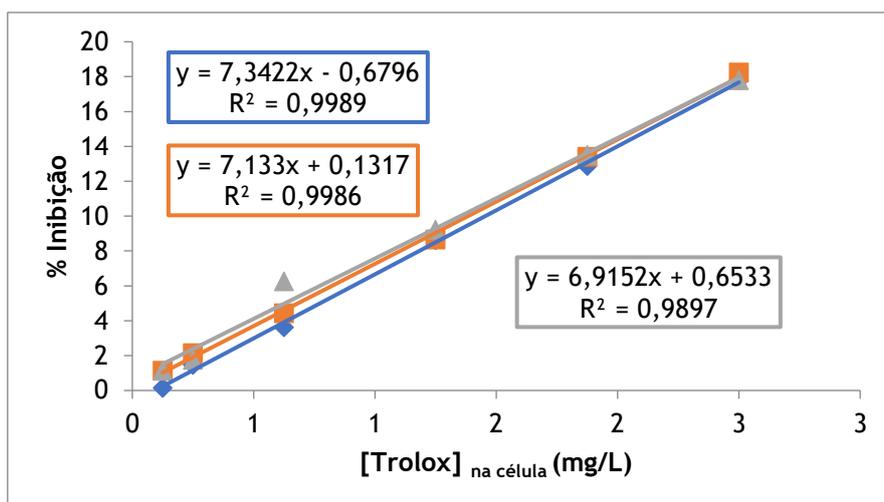


Figura 40: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no padrão trolox.

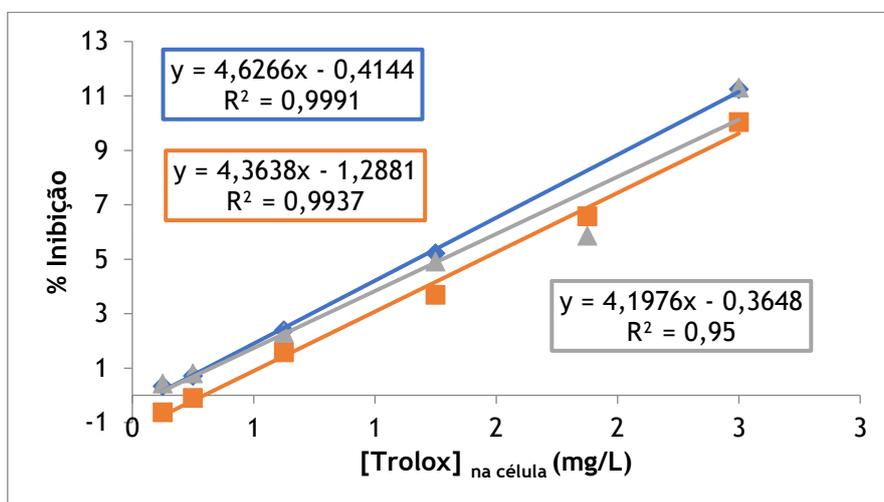


Figura 41: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no padrão trolox.

Tabela 12: Valor obtido de IC₅₀ para o padrão trolox através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.

Trolox		
[DPPH] = 0,080 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	5,108	4,734 ± 0,563
2	5,009	
3	4,086	
[DPPH] = 0,124 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	6,903	7,010 ± 0,118
2	6,991	
3	7,136	
[DPPH] = 0,200 mM		
Ensaio	IC ₅₀	Média ± Desvio padrão
1	10,897	11,549 ± 0,578
2	11,753	
3	11,998	
Média total ± Desvio médio IC ₅₀		
7,764 ± 2,523		

Padrão Ácido gálico

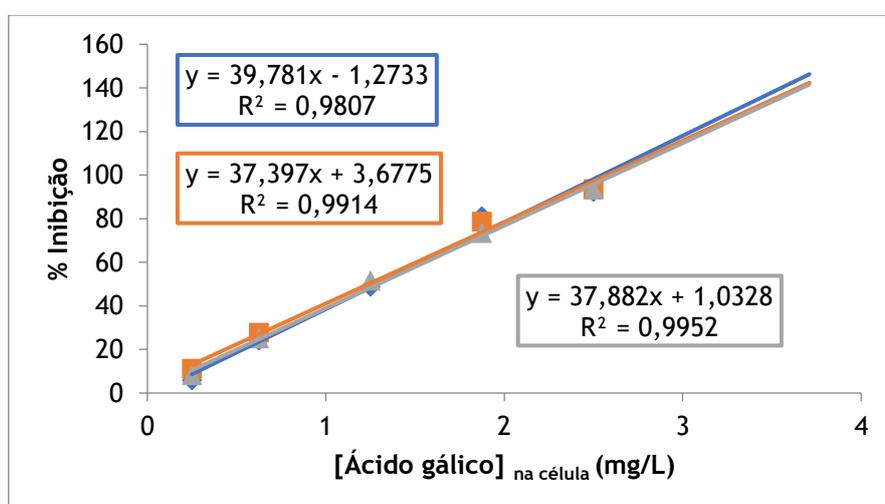


Figura 42: Curvas de calibração para a concentração 0,080 mM de DPPH no padrão ácido gálico.

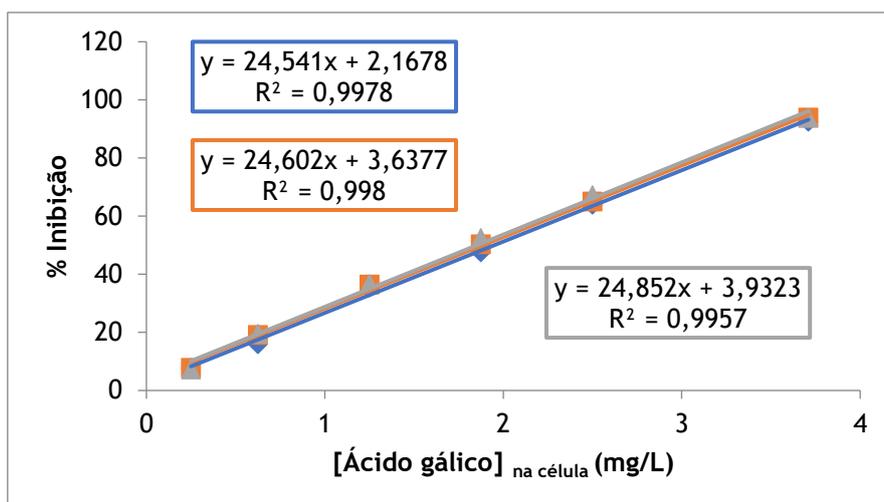


Figura 43: Curvas de calibração para a concentração 0,124 mM de DPPH no padrão ácido gálico.

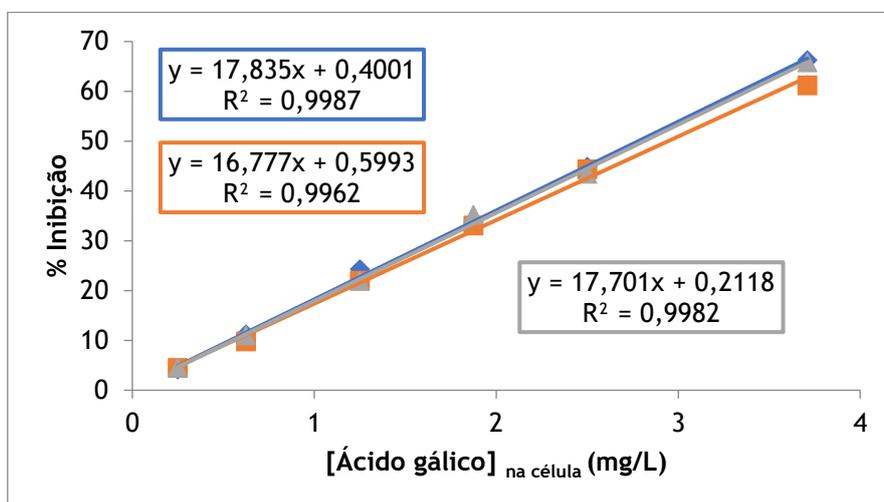


Figura 44: Curvas de calibração para a concentração 0,200 mM de DPPH no padrão ácido gálico.

Tabela 13: Valor obtido de IC₅₀ para o padrão ácido gálico através dos dados referentes às curvas de calibração de cada concentração de DPPH.

Ácido gálico		
[DPPH] = 0,080 mM		
Ensaio	IC₅₀	Média ± Desvio padrão
1	1,289	1,274 ± 0,030
2	1,239	
3	1,293	
[DPPH] = 0,124 mM		
Ensaio	IC₅₀	Média ± Desvio padrão
1	1,949	1,896 ± 0,049
2	1,884	
3	1,854	
[DPPH] = 0,200 mM		
Ensaio	IC₅₀	Média ± Desvio padrão
1	2,781	2,857 ± 0,105
2	2,977	
3	2,813	
Média total ± Desvio médio IC₅₀		
2,009 ± 0,565		

Anexo II: Comunicação oral

Abstract I

Phytochemical characterization and evaluation of antimicrobial properties of plants used in folk medicine

Coimbra A.T., Luís Â., Ferreira S., Duarte A.P.

*(XII Annual CICS-UBI Symposium, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior
Covilhã, 6 a 7 julho de 2017)*

XII Annual CICS-UBI Symposium
ABSTRACTS BOOK

**7 PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF
ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF PLANTS USED IN FOLK
MEDICINE**

Coimbra A.T., Ferreira S., Duarte A.P.

CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal.

Natural products have a great importance in disease treatment because some plants play a crucial role in the prevention of different human diseases and have received considerable attention as alternative therapeutic options. *Arbutus unedo* has been used as antiseptic and diuretic and to treat arterial hypertension. *Crataegus monogyna* reduce some cardiovascular risk factors and has been used to treat irritability, insomnia and memory loss. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of these two plants. For this purpose, the chemical composition of the leaves as well as their biological properties was studied.

The leaves were extracted with methanol and the methanolic extract was separated into fractions with solvents of increasing polarity. The phytochemical characterization was performed using colorimetric methods for total phenolic compounds and flavonoids quantification and for the determination of antioxidant activity using DPPH method and β -carotene bleaching assay. The extracts and fractions were tested for their antimicrobial activity against several microorganisms.

The results indicate that *A. unedo* has a greater amount of phenolic components than the *C. monogyna* and in contrast, *C. monogyna* has more flavonoids. Compared with the standards used in the determination of the antioxidant activity, both plants have antioxidant activity but lower than the standards. Regarding antimicrobial activity, most of the extracts and fractions inhibited the growth of strain *C. tropicalis*.

In sum, these plants have antioxidant activity and relevant antimicrobial activity against yeasts. These results are promising for the possible use of these extracts as food supplements, or even drugs.

Keywords: *Arbutus unedo*, *Crataegus monogyna*, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity.

Acknowledgements: This work was supported by FEDER funds through the POCI – COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalisation in Axis I – Strengthening research, technological development and innovation (Project No. 007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709).