

Herculano Hossi José

**Estudo da bioatividade de compostos
fitoquímicos de plantas medicinais africanas:
*Cochlospermum angolensis***

Mestrado Bioquímica em Saúde – Ramo Bioquímica Clínica e Metabólica

Julho, 2017

Escola Superior da Saúde - Instituto Politécnico do Porto

Herculano Hossi José

Estudo da bioatividade de compostos fitoquímicos
de plantas medicinais africanas: *Cochlospermum*
angolensis

Dissertação submetida à Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo Bioquímica Clínica e Metabólica, realizada sobre a orientação de Mónica Vieira, Professora Adjunta da área técnico-científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas, e coorientação de Cristina Prudêncio, Professora Coordenadora com Agregação da área técnico-científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas.

Julho, 2017

Agradecimentos

Através do exercício da fé, quero agradecer em primeiro lugar a Deus por me conceder saúde e capacidade de me manter em pé ao longo destes anos, aos meus pais Mário José e Hilária Atalama, Dr. Angelina Edna, Dr. Fernando Meira, ao Sr. Germano Santos, à dona Josefina, Dr.^a Cristina Prudêncio, Dr.^a Mónica Vieira, Dr. João Logarinho, à professora Sofia Cunha, à Técnica Cristiana Pena, a todos os colegas que direta ou indiretamente juntos fizeram com que os meus objetivos se concretizassem, a todos, os meus agradecimentos.

Foi muito difícil, entretanto mais uma vitória se avizinha e seguramente me proporcionara muita alegria, sejam bons ou maus momentos são essenciais a vida, mantiveram-me forte, humilde e humano, entretanto o êxito manter-me-á brilhante, o vosso apoio mantém-me esperançoso, mas Deus mantém-me de pé.

Resumo

Introdução

A *Cochlospermum angolensis* (Borututu) é uma planta com propriedades medicinais utilizada para o tratamento de patologia hepática e na profilaxia contra a malária. No entanto, são necessários mais estudos para comprovar a sua composição química e a sua atividade biológica.

Objetivo

Como a utilização desta planta é recorrente no seio da população angolana, o objetivo deste estudo foi descrever o estado de arte para a sua utilização, através do conhecimento popular e revisão bibliográfica existente; e avaliar a sua bioatividade, com a proporção de extratos aquosos e orgânicos e caracterização da bioatividade dos mesmos em organismos unicelulares, nomeadamente, bactérias e leveduras.

Métodos

Os extratos orgânicos e aquosos foram obtidos pela técnica de extração clássica, utilizando como solventes: água destilada, hexano, metanol, mistura metanol/água (50:50) e dimetilsulfóxido.

Conclusão

Com o desenvolvimento deste trabalho pretendeu-se contribuir para a elucidação da atividade biológica do Borututu, uma vez que é uma planta bastante utilizada em Angola, para fins medicinais. Os resultados obtidos indicam que a *C. angolensis* (Borututu) apresenta, na sua constituição, compostos químicos que lhe conferem propriedades de inibição do crescimento de bactérias e leveduras. Com estes resultados, pode-se inferir que o Borututu poderá apresentar propriedades de interesse para as indústrias farmacêutica e alimentar.

Palavras-chave: *Cochlospermum angolensis*, atividade antimicrobiana, extratos orgânicos e aquosos

Abstract

Introduction

Cochlospermum angolensis (Borututu) is a plant with medicinal properties used for the treatment of hepatic pathology and in prophylaxis against malaria. However, further studies are needed to prove its chemical composition and biological activity.

Objectives

As the use of this plant is recurrent within the Angolan population, the main objectives of this study were to describe the state of art for its use, through popular knowledge and existing bibliographic literature; and to evaluate its bioactivity, with the proportion of aqueous and organic extracts and characterization of the bioactivity of the extracts obtained in unicellular organisms, namely, bacteria and yeasts.

Methods

Organic and aqueous extracts were obtained by the classical extraction technique, using as solvent: distilled water, hexane, methanol, methanol/water (50:50) and dimethylsulfoxide.

Conclusion

With the development of this work, it was intended to contribute to the elucidation of the biological activity of Borututu, since it is a plant widely used in Angola for medicinal purposes. The results obtained indicate that *C. angolensis* (Borututu) has chemical compounds which have inhibitory properties against bacteria and yeasts. With these results, it can be inferred that Borututu may present properties of interest to the pharmaceutical and food industries.

Key words: *Cochlospermum angolensis*, antimicrobial activity, organic and aqueous extracts

Índice

Índice	9
Introdução.....	15
Material e métodos	25
Resultados.....	33
Discussão e conclusão	49
Bibliografia.....	53

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Por extenso
Abs	Absorvância
a.C	Antes de Cristo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MIC	Concentração mínima inibitória
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina
nm	Nanómetros
OH	Hidróxilo
OMS	Organização Mundial da Saúde
O ₂ ⁻	Anião Radical Superóxido
ROOR	Hidroperóxido
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
T0	Leitura da DO tempo zero do ensaio
T24	Leitura da DO após incubação por 24h
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

Índice de figuras

Figura 1: Árvore do borututu.....	18
Figura 2: Raiz do borututu.....	19
Figura 3: Esquema geral da extração de novos compostos bioativos.....	21
Figura 4: Curva de crescimento bacteriano.	23
Figura 5: Testes de sensibilidade na levedura <i>S. cerevisiae</i>	36

Índice de gráficos

Gráfico 1: Curvas de crescimento da <i>E. coli</i> e isolados S3R9 e S3R22.....	37
Gráfico 2: Curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>S. aureus</i> MRSA.....	37
Gráfico 3: Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	38

Índice de tabelas

Tabela 1: Quantidades (μL) dos extratos, meios de cultura e das estirpes em estudo....	30
Tabela 2: Quantidades (μL) dos controlos negativos e positivos.....	31
Tabela 3: Resultado das medições dos halos de inibição dos testes de sensibilidade (cm) de diâmetro em <i>S. cerevisiae</i>	36
Tabela 4: Resultados do ensaio de toxicidade para o <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	39
Tabela 5: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para o <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	39
Tabela 6: Resultados do ensaio de toxicidade para o <i>S. aureus</i> MRSA.....	40
Tabela 7: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para o <i>S. aureus</i> MRSA.....	40
Tabela 8: Resultados do ensaio de toxicidade para a <i>S. cerevisiae</i>	41
Tabela 9: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para a <i>S. cerevisiae</i>	42
Tabela 10: Resultados do ensaio de toxicidade para <i>E. coli</i> 25922.....	42
Tabela 11: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para a <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	43
Tabela 12: Resultados do ensaio de toxicidade para o isolado S3R9.....	44
Tabela 13: Resultados em percentagem de toxicidade para o isolado S3R9.....	44
Tabela 14: Resultados do ensaio de toxicidade para o isolado S3R22.....	45
Tabela 15: Resultados em percentagem de toxicidade para o isolado S3R22.....	45
Tabela 16: Determinação da sensibilidade da <i>E. coli</i> aos extratos.....	46
Tabela 17: Determinação da sensibilidade para os isolados S3R9 e S3R22.....	46
Tabela 18: Determinação da sensibilidade para o <i>S. aureus</i> ATCC 6538 e <i>S. aureus</i> MRSA.....	47
Tabela 19: Determinação da sensibilidade para o <i>S. cerevisiae</i>	47

Introdução

1. Utilização das plantas medicinais

A fitoterapia é uma prática antiga, que data dos anos 4000 a.C. Os primeiros registros médicos encontram-se no museu da Pensilvânia e datam do ano 2100 a.C. As propriedades antibióticas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas, em consequência do metabolismo secundário, foram também reconhecidas há séculos, mas a comprovação científica da atividade destas substâncias é recente ^{1 2}.

No passado, a fitoterapia era mais utilizada pelas populações mais carenciadas das zonas rurais e urbanas em todo o mundo, por diversos motivos, entre os quais, questões culturais, difícil acesso das populações aos medicamentos, fácil disponibilidade, baixo custo, a ideia de que os produtos naturais são inócuos e o aumento da resistência dos agentes patogénicos aos antibióticos ^{1 3}.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial recorre à fitoterapia para os cuidados primários de saúde no tratamento de várias doenças, sendo importante a implementação de programas que visem a proteção deste recurso ^{4 5 6}.

Muitos dos fármacos comercializados hoje em dia são modificações sintéticas ou cópias de substâncias obtidas naturalmente a menos custo, exemplo: proteínas, anticorpos, imunoadesina ^{7 8}.

2. Bioatividade de compostos fitoquímicos

As plantas medicinais têm um papel muito importante na saúde em todo o mundo. No entanto, e apesar dos avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, o uso de plantas medicinais ainda é frequente. Estima-se que cerca de 25% a 30% de todas as drogas reconhecidas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais ⁹.

Os estudos realizados, comprovam a bioatividade de alguns compostos presentes em plantas utilizadas para fins medicinais, como compostos fenólicos, antioxidantes (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido elágico), entre outros ^{10 11}.

O efeito dos polifenóis mobiliza o sistema imunitário, especialmente no recrutamento de macrófagos e eosinófilos no alívio de sintomas de colite crónica, assim como, na obesidade e nos traumas. Alguns dos efeitos dos polifenóis são: (i) capacidade antioxidante, (ii) anti-hipertensivo, (iii) hipoglicémico, (iv) hipocolesterolémico. No entanto, muitos desses efeitos foram testados em animais, daí ser necessário a realização de estudos com seres humanos para confirmar os benefícios atribuídos a estes compostos ^{4 12}.

2.1. Borututu (*Cochlospermum angolensis*)

O borututu (*Cochlospermum angolensis*) (figura 1) originalmente chamado de Ofefe em Umbundo (língua tradicional da região centro e sul de Angola), em Português (borututu), cientificamente é conhecido por *C. angolensis*. É uma espécie endémica capaz de atingir 6 m de altura e 20 cm de diâmetro, a casca é acinzentada e fissurada longitudinalmente, as folhas palmadas com 5 a 7 segmentos medindo 15 a 18 cm de largura e 8 a 10 cm de comprimento, as folhas são amarelas, os frutos são verdes e passam a castanho quando maduros com sementes pretas. A sua disseminação é realizada pelo vento que transporta as sementes envolvidas no extrato interior do fruto ^{11 13}.



Figura 1: Árvore do borututu. (Sanfilippo, 2014)

Esta planta pertence à família *Cochlospermaceae* composta por dois géneros (*Amoreuxia Moc* e *Cochlospermum Willd.*). Conhecem-se 38 espécies distribuídas em regiões tropicais devido às condições climáticas que estas exigem para o seu crescimento (18 a 26 °C). Estas regiões localizam-se na América, Austrália, Oeste de África Central e na Indo Malásia^{14 15 16}.

2.1.1. Origem/importância

O *C. angolensis* é de origem exclusiva do sul e oeste de Angola. Esta planta assume extrema importância visto que a população local usa infusões da raiz (figura 2), folha e casca para o tratamento e prevenção de inúmeras doenças, principalmente no tratamento de patologia hepática, assim como na prevenção da malária¹⁷. São vários os estudos que sustentam a tese de que o *C. angolensis* possui inúmeros benefícios^{18 10}. Segundo Leonardi *et al.*, os compostos voláteis de folhas e raízes de *C. angolensis* contêm sesquiterpenos, germacreno D, α Cadinol, 10 epicubenol, β caryophyllene e isoborneol¹¹.



Figura 2: Raiz do borututu. (Kimbandeiro Kangupe)

2.1.2. Aplicações medicinais conhecidas

O Borututu é utilizado tradicionalmente, na profilaxia da malária, no tratamento de icterícia, como agente anti-tumoral, com atividade hepatocitotóxica no tumor do fígado, no tratamento de doenças gastrointestinais especialmente no tratamento de úlceras gástricas e dores do estômago apresenta atividade antioxidante^{19 20}. É, também utilizado pelas suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias^{21 22 23}.

É utilizado no tratamento de leucorreia, doenças da pele e em doenças sexualmente transmissíveis assim como também em casos de infertilidade ^{24 25}.

2.1.3. Atividade antimicrobiana conhecida

Tem sido reportada atividade antimicrobiana em Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-positivos (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*-MRSA), assim como atividade anti-plasmodium ²⁶. Foi demonstrado por Carla Pereira que a infusão da raiz do *C. angolensis* inibe a síntese do DNA em eritrócitos de rato infetados por *Plasmodium falciparum* e *P. berghei* ²⁶.

3. Extração de compostos bioativos

Atualmente existem várias metodologias disponíveis para extração de compostos bioativos. Pino *et al.* indicam a necessidade de combinação de três tecnologias:

1. Técnicas de separação (extração, partição e cromatografia);
2. Métodos que permitem a identificação estrutural (espectrometria, conversões químicas e cristalografia de raios X);
3. Bioensaios.

A bioatividade dos extratos deve ser testada. Seguidamente os extratos com bioatividade devem ser selecionados, fracionados com ensaios dirigidos e os compostos com atividade identificados. O fracionamento tem demonstrado eficácia no isolamento e caracterização dos constituintes ativos presentes em extratos de produtos naturais.

A figura 3 resume as etapas de extração de novos compostos bioativos.

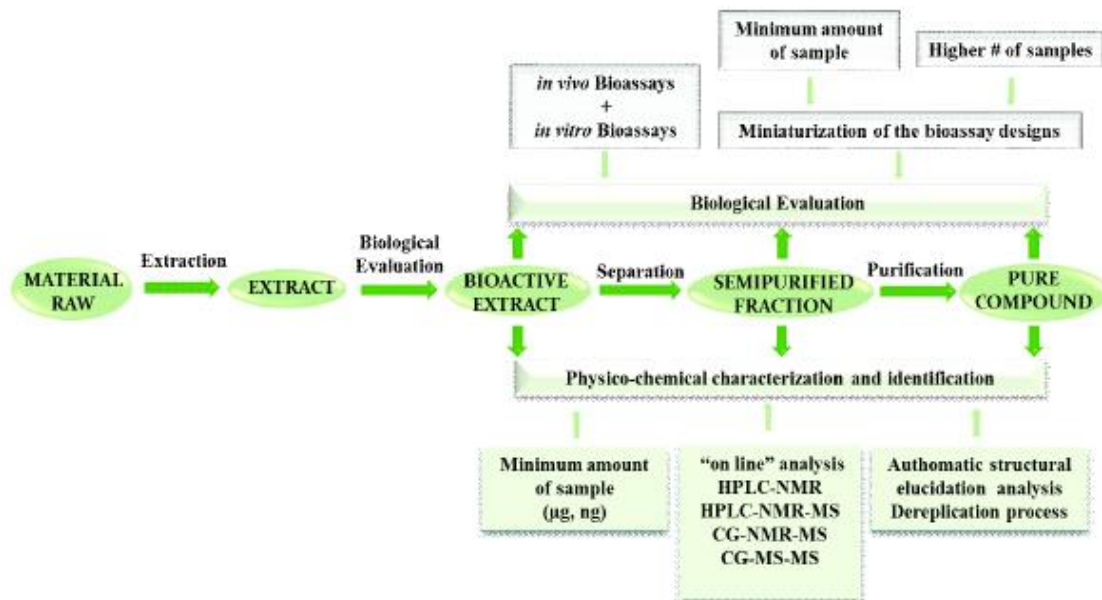


Figura 3: Esquema geral da extração de novos compostos bioativos. (Pino *et al.*, 2013)

3.1. Modelos de estudo da bioatividade dos extratos naturais

Há vários modelos de estudo para avaliar a bioatividade dos extratos naturais, desde modelos bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases, *Proteus mirabilis*, *MRSA*), alguns parasitas como *Plasmodium falciparum* e *P. berghei* e leveduras²⁶.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um dos modelos mais usados como sistema eucariótico unicelular para estudos da bioatividade. Possui um metabolismo semelhante ao de eucariontes superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de destoxificação que não estão presentes em bactérias²⁸. Os ensaios em células eucarióticas permitem a avaliação da bioatividade de inúmeros compostos de forma rápida, económica e reprodutível²⁹.

Na avaliação da bioatividade é mais vantajoso utilizar microrganismos pois (i): Animais de laboratório geralmente dificultam o manuseio; (ii): é necessário um número elevado de animais para garantir resultados estatisticamente significativos; (iii): os microrganismos são mais fáceis de manusear; (iv): possuem um crescimento rápido e (v) pode-se utilizar grandes quantidades de células com as mesmas características genéticas²⁹.

4. Curva de crescimento

A curva de crescimento microbiana tem como objetivo, identificar as diferentes fases de crescimento microbiano em função do tempo. O crescimento pode ser influenciado por fatores físicos (temperatura, pH e pressão osmótica); fatores químicos (fontes de carbono, azoto, enxofre, fósforo, oxigénio) e fatores orgânicos (vitaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas)³⁰. A curva de crescimento compreende as seguintes fases, que se apresentam na figura 4:

- Fase lag: é a fase mais curta, caracteriza-se pela síntese proteica, pela ausência ou pouca divisão celular depende muito das condições fisiológicas do inóculo e adaptação ao meio;
- Fase log (exponencial): é a fase em que se verifica o maior crescimento. É a fase mais adequada para a avaliação do crescimento do microrganismo em estudo;
- Fase estacionária: esta fase caracteriza-se pela ausência de crescimento líquido, com momentos de estabilização da população celular;
- Fase de declínio ou morte: é uma fase crítica por vários motivos (esgotamento de nutrientes, acumulação de resíduos do metabolismo e a alteração do pH), fatores estes que conduzem a morte celular.

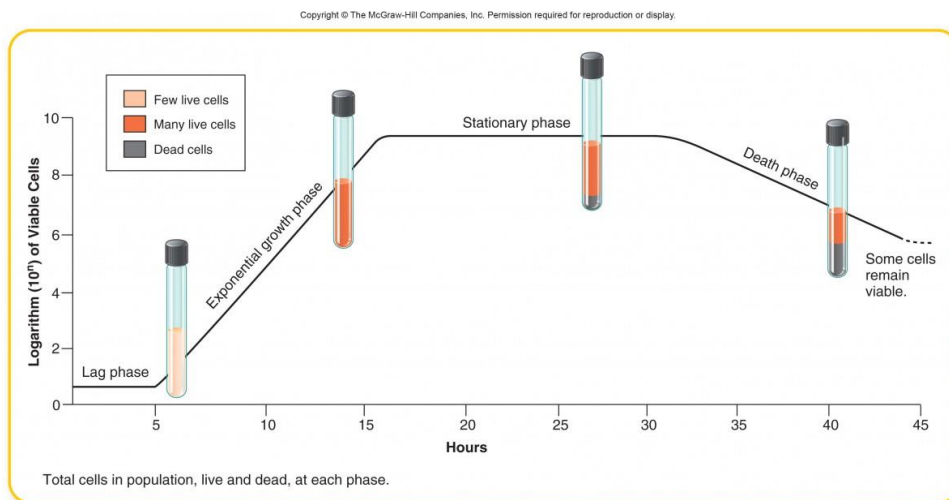


Figura 4: Curva de crescimento bacteriano. (https://online.science.psu.edu/micrb106_wd/node/6122)

5. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é estudar a bioatividade da *Cochlospermum angolensis*.

Os objetivos específicos são estudar o estado de arte para a utilização de *C. angolensis*; preparar extratos aquosos e orgânicos de *C. angolensis*; caracterizar a bioatividade dos extratos obtidos; avaliar a bioatividade dos extratos em organismos unicelulares, nomeadamente, bactérias e leveduras.

Material e métodos

Amostra

A planta (*C. angolensis*) foi colhida na comuna do Longonjo, província do Huambo (Angola) a 26 de dezembro de 2016 por um mkimbandeiro. Segundo este, o método de colheita usado foi o método tradicional. Consiste em escavar a terra ao redor da raiz de forma a segui-la na sua totalidade, lavou-se para a manter limpa de terras e cortou-se em pedaços mais pequenos para melhor conservação no laboratório da Escola Superior de Saúde.

Material/Equipamento

Equipamento

Manta de aquecimento (J.P.selecta, s.a, Barcelona); serra para corte; balança (Kern ABJj); tina para triturar; destilador (GFL Gesellshoft Labotechnik); autoclave (Uniclave 88-40x60, A. J. Costa); estufa (Selecta); vortex (Labnet international, inc); Thermo Spectronic (American APPraiSAL); Bico de bunsen (CAMPINGAZ); banho maria FALCON; Thermo Scientific Multiskanfc (Vantoa Filand); Thermo Scientific Multiskanfc (Vantoa Filand); Incuboting Orbital Skaka. Placas de 96 poços (Frilabo); Bico de bunsen (CAMPINGAZ). Incuboting Orbital Skaka.

Consumíveis

Filtros de 0,45 μ m e de 0,22 μ m (VWR – International); Tubos de ensaio 12x75mm (Kimble); ansas de 1 μ m-10 μ m; Placas de Petri; zaragatoa; discos de impregnação (LaBorclin); Placas de 96 poços (Frilabo); pipetas Pasteur; Micropipetas 10/100 μ l 100/1000 μ l;

Meios de cultura

Yeast Extraxt Peptone Dextrose (YEPD), (Sigma);

Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck);

Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck);

Agar nutritivo para as bactérias.

Reagentes

Metanol ($\geq 99.8\%$) (José Manuel Gomes dos Santos, LDA); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Biochemica Applichen Panreac ITW Companies); Hexano ($\geq 95.0\%$) (Carlos Erba Reagents)

Estirpes usadas

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Staphylococcus aureus MRSA

Escherichia coli ATCC 25922

Isolados ambientais do grupo de trabalho, identificados por S3R9 e S3R22 (bastonetes Gram-negativos).

1. Extração (aquosa e orgânica)

A amostra foi seca à temperatura ambiente e protegida da luz. Foi em seguida triturada até à obtenção de pedaços mais finos. Os extratos foram preparados com base na metodologia de Khoddami *et al.* (2013). Assim:

- (i) Para obtenção do extrato orgânico adicionou-se à amostra metanol ($\geq 99.8\%$), n-hexano ($\geq 95.0\%$) e DMSO após a maceração da raiz ³¹, na proporção de 2:10 para extração por 24 horas ou mais, à temperatura ambiente. Procedeu-se à concentração do extrato por destilação a 40-80 °C. Em seguida foi realizada a filtração de cada extrato por membrana filtrante (0,45 μm);
- (ii) Para a obtenção do extrato aquoso, a extração foi realizada utilizando-se como solvente extrator a água destilada estéril nas seguintes proporções 1:10, ou seja, 50g de raiz para 500mL de água destilada. Levou-se à ebulição durante 60 minutos e procedeu-se à filtração e destilação ³².

Ambos os extratos foram armazenados a 4 °C até o momento do uso.

2. Preparação dos inóculos

As culturas de microrganismos foram mantidas a 4°C em agar nutritivo e foram recuperadas, sempre que necessário, em TSA (*Tryptic Soy Agar*) para bactérias e agar YEPD para levedura (segundo Daniele Grazziotin Soares), e incubadas 24h a 35 °C, com exceção de *S. cerevisiae*, que foi incubado a 30 °C pelo mesmo período de tempo.

Foram preparadas suspensões da cultura em solução salina (0,85% NaCl), utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até a obtenção de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/mL para bactérias e $2,0 \times 10^6$ CFU/mL para levedura, sendo esta escala correspondente a uma densidade ótica (DO) entre 0.08 a 0.10 a 600nm, que foi medida por espectrofotometria visível³³.

3. Testes de sensibilidade com *S. cerevisiae*

Avaliou-se a suscetibilidade antimicrobiana de acordo com o método de difusão em disco, de acordo com recomendações do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram preparadas suspensões da levedura *S. cerevisiae* de acordo com o ponto de padronização dos inóculos acima descrito.

Em seguida fez-se a inoculação do microrganismo pela técnica de distensão na superfície de uma placa de petri com meio. Os discos de papel impregnados com 20µL de cada extrato a ser testado, foram aplicados com uma pinça estéril sobre uma placa de Petri com meio de cultura YEPD contendo, previamente inoculado, *S. cerevisiae*. Incubou-se durante 18-24h a 30 °C. Após a incubação, os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimétrica.^{34 33}.

Para os controlos utilizaram-se as referidas soluções (Metanol, Hexano e DMSO) impregnadas nos discos, uma vez que não se verificou inibição de crescimento algum em torno dos controlos, indica-nos que a inibição verificada em torno dos extratos é de origem do extrato.

4. Curva de crescimento

Foram preparadas suspensões dos microrganismos em estudo de acordo com o ponto de padronização dos inóculos acima descrito. As suspensões bacterianas foram incubadas a

35 °C e as de levedura 30 °C num banho com agitação (120rpm). Os pontos da curva de crescimento das bactérias foram sendo retirados de 25 em 25 minutos, enquanto os pontos da curva de crescimento da levedura foram sendo retirados de 60 em 60 minutos, com leitura de DO a cada ponto.

5. Ensaio de toxicidade dos solventes

Neste ensaio usaram-se os solventes usados na preparação dos extratos (metanol, DMSO e n-hexano). Realizaram-se diluições numa cultura de cada estirpe no solvente em placas de 96 poços e verificou-se a DO a 600nm (T0). Após incubação, em incubadora orbital com agitação (120rpm) durante 24h a 35 °C para as bactérias e a 30 °C para a levedura, realizou-se a leitura da DO (T24).

6. Determinação da sensibilidade das estirpes aos extratos

Tabela 1: Quantidades (µL) dos extratos, meios de cultura e das estirpes em estudo.

Ensaio (µL)	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> MRSA
	Meio + Extrato + Cultura	Meio + Extrato + Cultura	Meio + Extrato + Cultura
Água	50+100+50	50+100+50	50+100+50
Hexano	50+100+50	50+100+50	50+100+50
Metanol	90+20+90	90+20+90	90+20+90
DMSO	60+80+60	80+40+80	80+40+80
Ensaio (µL)	S3R9	S3R22	<i>E. coli</i>
	Meio + Extrato + Cultura	Meio + Extrato + Cultura	Meio + Extrato + Cultura
Água	50+100+50	50+100+50	50+100+50
Hexano	50+100+50	50+100+50	50+100+50
Metanol	90+20+90	90+20+90	90+20+90
DMSO	95+10+95	95+10+95	95+10+95

Neste ensaio usaram-se os extratos destilados e brutos da raiz do Borututu obtidos do processo de extração. Distribuiu-se em cada poço em triplicado o volume de meio de cultura de acordo com o microrganismo (TSB para bactérias e caldo YEPD para a levedura), em seguida adicionou-se o volume de extrato e finalmente o volume de suspensão de estirpe em estudo. Verificou-se a DO a 600nm (T0). Após incubação realizou-se a leitura da DO (T24).

Ambos os controlos, negativo e positivo foram realizados em triplicado nas proporções representadas na tabela 2.

Tabela 2: Quantidades (μL) dos controlos negativos e positivos.

Controlos (μL)	Controlos positivo Meio + Cultura	Controlos negativo Meio + Extrato
Água	100+100	100+100
Hexano	100+100	100+100
Metanol	100+100	20+180
DMSO	100+100	80+120

A determinação da sensibilidade das estirpes aos extratos pode ser entendida como o menor volume de extrato em μL , capaz de inibir o crescimento microbiano.

Tratamento de dados

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão calculados no programa Microsoft Excel. Todos os testes foram realizados em triplicado ($n=3$).

Resultados

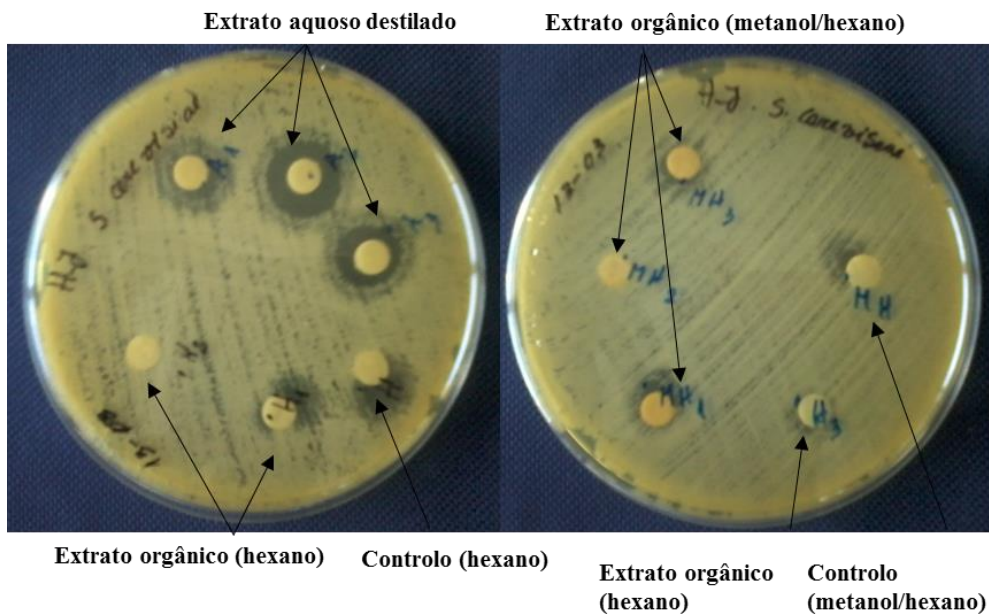
1. Extratos

1.1. Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos recorrendo ao método clássico através da técnica de separação extração e destilação. Na extração aquosa levou-se a ebulição o extrato de 50g de Borututu em 500mL de água destilada, durante 15 minutos. Após arrefecimento o extrato foi filtrado em filtros de 0,45 μ m e 0,22 μ m e levado a destilação. Para os extratos orgânicos preparou-se uma proporção de 25g em 250mL de solvente (Hexano, Metanol e DMSO), durante 24h, de igual modo após filtração, o filtrado foi levado à destilação.

1.2. Testes de sensibilidade

A figura 5 apresenta os resultados do teste de sensibilidade da *S. cerevisiae* para os vários extratos aquosos/orgânicos e brutos/destilados testados.



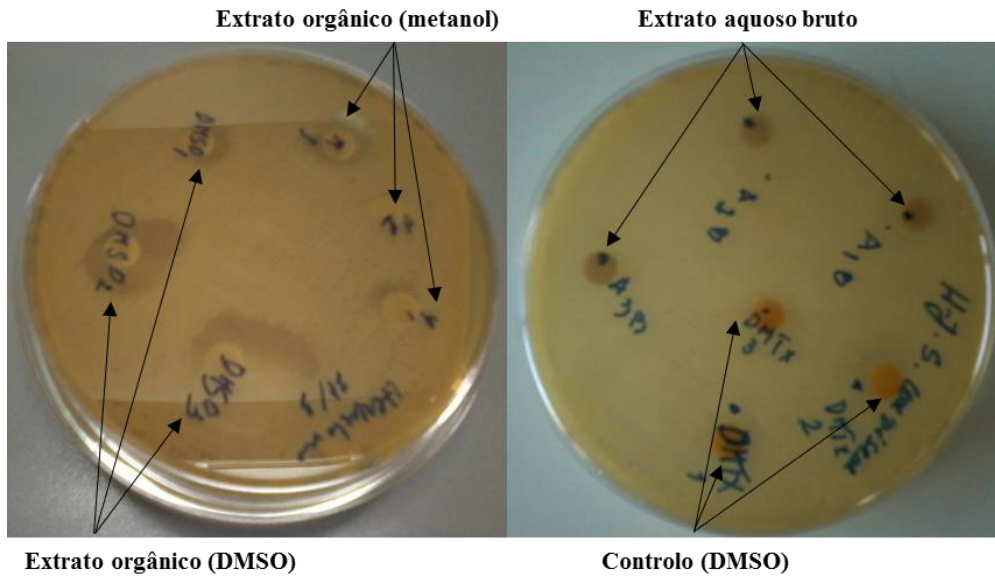


Figura 5: Testes de sensibilidade na levedura *S. cerevisiae*.

Na tabela 3 apresenta os resultados do ensaio da sensibilidade para a levedura *S. cerevisiae*. Os controlos foram realizados com os discos impregnados apenas no solvente.

Tabela 3: Resultado das medições dos halos de inibição dos testes de sensibilidade (cm) de diâmetro em *S. cerevisiae*

Extrato ($\bar{x} \pm \sigma$)	Água	DMSO	Hexano	Metanol/H exano	Metanol	Controlo
Diâmetro (cm)	1,23±0,20	1,23±0,16	1,23±0,20	0,0±0,0	0,33±0,20	0,0±0,0

Legenda: \bar{x} – média; σ – desvio padrão

Analisando a tabela 3, verifica-se que os extratos de água, DMSO, metanol e hexano apresentaram poder inibitório. Entretanto a mistura metanol/hexano não apresentou qualquer inibição. O controlo por sua vez não registou um crescimento à volta do disco, o que indica que a inibição é imposta pelo extrato do borututu.

2. Curvas de crescimento

O gráfico 1 apresenta as curvas de crescimento realizadas para as bactérias Gram-negativas em estudo (*E. coli* e isolados ambientais). Verificou-se que para estas estirpes o ponto médio da fase logarítmica é aos 75 minutos de crescimento. Posto isto, todos os

ensaios foram realizados com amostras retiradas aos 75 minutos de crescimento exponencial.

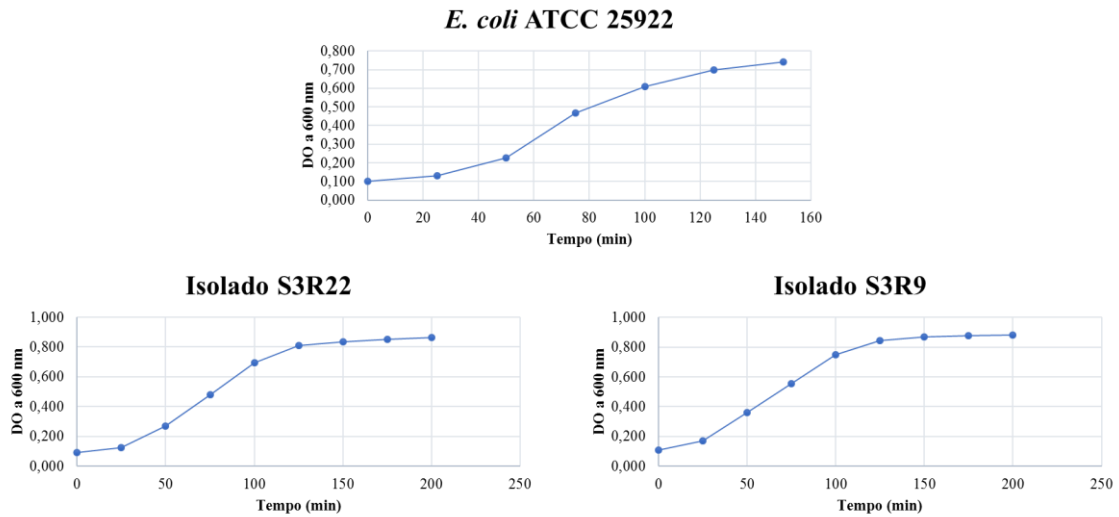


Gráfico 1: Curvas de crescimento da *E. coli* e isolados S3R9 e S3R22.

O gráfico 2 apresenta as curvas de crescimento realizadas para as bactérias Gram-positivas em estudo (*S. aureus* e *S. aureus* MRSA). Verificou-se que para estas estirpes o ponto médio da fase logarítmica é aos 125 minutos de crescimento. Assim, todos os ensaios foram realizados com amostras retiradas aos 125 minutos de crescimento exponencial.

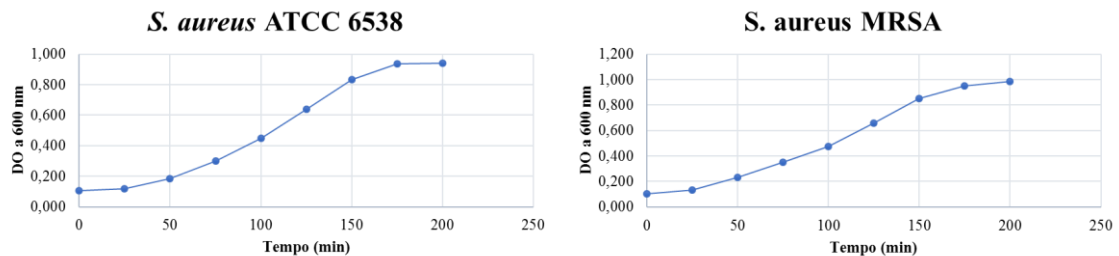


Gráfico 2: Curvas de crescimento de *S. aureus* e *S. aureus* MRSA.

O gráfico 3 apresenta a curva de crescimento realizada para o modelo eucarionte em estudo (*S. cerevisiae*). Verificou-se que para esta estirpe o ponto médio da fase logarítmica é às 6h de crescimento. Assim, todos os ensaios foram realizados com amostras retiradas às 6h de crescimento exponencial.

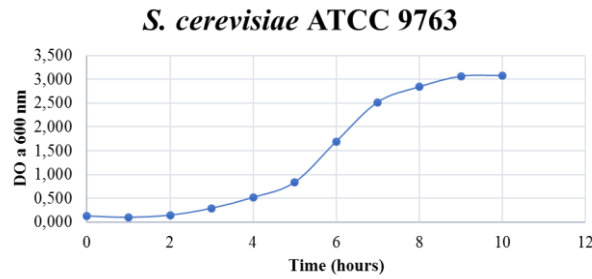


Gráfico 3: Curva de crescimento de *S. cerevisiae*.

3. Ensaio de toxicidade dos solventes

Nas tabelas 4 a 15 estão representados os resultados dos ensaios de toxicidade e as suas respectivas percentagens para as estirpes usadas no estudo *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* MRSA, *S. cerevisiae*, *E. coli*, S3R9 e S3R22, respetivamente. É indicada a média e o desvio padrão para cada ensaio (realizado em triplicado) e para cada solvente. Os dados apresentados são da DO a 600 nm no tempo (T0) e após 24h de incubação (T24).

Nas tabelas 4 e 5 estão representados os resultados do ensaio de toxicidade para o *S. aureus* ATCC 6538. Dos resultados obtidos pode indicar-se que o hexano é o solvente menos tóxico, visto que se verificou toxicidade semelhante para todas as proporções realizadas, e apresentou percentagens de crescimento maiores que nos outros solventes (entre 16 e 79%). Obteve-se, ainda, a média e o desvio padrão de $1,07 \pm 0,01$. O DMSO com a média e o desvio padrão de $0,79 \pm 0,01$ na proporção de 20/80, é o solvente com toxicidade intermédia. Finalmente, o metanol, com a média e o desvio padrão de $1,00 \pm 0,04$ na proporção de 10/90, apresentou menores percentagens de crescimento (entre 13-37%).

Tabela 4: Resultados do ensaio de toxicidade para o *S. aureus* ATCC 6538.

Proporção solvente/cultura	DMSO		Metanol		Hexano	
	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)
95/05	0,85±0,00	0,32±0,02	0,83±0,00	0,13±0,07	1,59±0,08	0,89±0,27
90/10	0,84±0,00	0,25±0,02	0,82±0,00	0,30±0,02	1,44±0,07	1,14±0,19
80/20	1,00±0,00	0,40±0,00	0,91±0,00	0,14±0,05	2,13±0,01	0,33±0,18
70/30	1,09±0,00	0,36±0,07	1,32±0,00	0,32±0,01	2,20±0,00	0,49±0,11
60/40	1,48±0,01	0,52±0,02	1,06±0,02	0,17±0,05	1,89±0,00	0,38±0,26
50/50	1,00±0,01	0,30±0,08	2,86±0,16	0,36±0,04	3,16±0,15	1,07±0,01
40/60	1,73±0,01	0,51±0,02	2,47±0,03	0,45±0,16	2,58±0,01	0,93±0,02
30/70	2,16±0,06	0,46±0,11	2,81±0,01	0,70±0,12	3,02±0,01	0,94±0,04
20/80	2,56±0,01	0,79±0,01	3,22±0,00	0,59±0,40	3,08±0,00	0,98±0,06
10/90	2,87±0,01	0,63±0,12	3,15±0,00	1,00±0,04	3,47±0,02	1,00±0,00
05/95	3,30±0,01	0,89±0,02	3,45±0,01	1,07±0,01	3,47±0,00	1,09±0,03

Legenda: x – média; σ – desvio padrão

Tabela 5: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para o *S. aureus* ATCC 6538.

Proporção solvente/cultura	DMSO	Metanol	Hexano
95/05	37,71 %	16,26 %	56,09 %
90/10	30,09 %	37,35 %	79,20 %
80/20	40,32 %	15,87 %	15,56 %
70/30	33,06 %	24,09 %	22,25 %
60/40	35,73 %	16,46 %	20,42 %
50/50	30,29 %	12,67 %	34,06 %
40/60	29,84 %	18,46 %	36,36 %
30/70	21,46 %	25,21 %	31,40 %
20/80	30,92 %	18,37 %	31,74 %
10/90	21,94 %	31,73 %	29,07 %
05/95	26,96 %	30,95 %	31,59 %

Nas tabelas 6 e 7 estão representados os resultados do ensaio de toxicidade para o *S. aureus* MRSA. Após análise dos resultados verifica-se que o metanol, com a média e o desvio padrão de 0,90±0,05 na proporção de 10/90, é, novamente, o solvente mais tóxico apresentando menores percentagens de crescimento. De salientar os 5 ensaios com percentagens inferiores a 10% de crescimento. Foi possível, ainda, apurar que o hexano é o solvente menos tóxico, visto que se verificou toxicidade semelhante para todas as proporções realizadas, obtendo-se após incubação a média e o desvio padrão de

0,70±0,04. Relativamente às percentagens de crescimento com o hexano, estas variam entre 10 e 70%. O DMSO com a média e o desvio padrão de 0,77±0,18 na proporção de 20/80, é o solvente com toxicidade intermédia.

Tabela 6: Resultados do ensaio de toxicidade para o *S. aureus* MRSA.

Proporção solvente/cultura	DMSO		Metanol		Hexano	
	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)
95/05	0,85±0,00	0,08±0,00	1,03±0,01	0,09±0,00	1,53±0,09	0,81±0,64
90/10	0,91±0,00	0,29±0,00	0,97±0,02	0,07±0,00	1,21±0,04	0,84±0,45
80/20	0,94±0,00	0,17±0,15	1,29±0,00	0,08±0,00	2,01±0,03	0,65±0,26
70/30	1,05±0,01	0,33±0,01	1,09±0,06	0,17±0,16	2,58±0,02	0,30±0,19
60/40	1,12±0,00	0,22±0,10	2,41±0,01	0,10±0,01	2,28±0,01	0,23±0,06
50/50	1,34±0,00	0,38±0,03	2,41±0,01	0,18±0,01	3,07±0,01	0,70±0,04
40/60	2,16±0,01	0,41±0,33	2,75±0,04	0,40±0,05	2,87±0,00	0,69±0,06
30/70	2,59±0,02	0,66±0,35	3,18±0,02	0,51±0,07	3,18±0,00	0,72±0,09
20/80	2,84±0,01	0,77±0,18	3,44±0,01	0,62±0,04	3,28±0,01	0,72±0,05
10/90	3,65±0,00	0,75±0,03	3,51±0,01	0,90±0,05	3,60±0,02	0,79±0,10
05/95	3,42±0,01	0,66±0,15	3,74±0,00	0,89±0,03	3,69±0,00	0,77±0,00

Legenda: x – média; σ – desvio padrão

Tabela 7: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para o *S. aureus* MRSA.

Proporção solvente/cultura	DMSO	Metanol	Hexano
95/05	9,66 %	9,09 %	53,43 %
90/10	31,91 %	7,71 %	69,80 %
80/20	18,51 %	6,66 %	32,73 %
70/30	31,27 %	15,73 %	11,86 %
60/40	20,30 %	4,54 %	10,42 %
50/50	28,65 %	7,74 %	23,06 %
40/60	19,16 %	14,69 %	24,19 %
30/70	25,77 %	16,19 %	22,87 %
20/80	27,34 %	18,11 %	21,98 %
10/90	20,65 %	25,63 %	21,90 %
05/95	19,36 %	24,00 %	20,89 %

Nas tabelas 8 e 9 são apresentados os resultados do ensaio de toxicidade para o *S. cerevisiae*. Verifica-se, mais uma vez, que o hexano é o solvente menos tóxico, visto que se verificou menor toxicidade nas mesmas proporções de solvente/cultura (50/50), obtendo-se após incubação a média e o desvio padrão de 1,89±0,17. Para este solvente as

percentagens de crescimento variam entre 16 e 60%. O metanol, com a média e o desvio padrão de $0,69 \pm 0,03$ na proporção de 10/90, é o solvente mais tóxico, com percentagens de crescimento entre 6 e 15%. Para o DMSO, com a média e o desvio padrão de $0,41 \pm 0,02$ na proporção de 20/80, registaram-se valores intermédios de crescimento (13-24%).

Tabela 8: Resultados do ensaio de toxicidade para a *S. cerevisiae*.

Proporção solvente/cultura	DMSO		Metanol		Hexano	
	T0 ($\bar{x} \pm \sigma$)	T24 ($\bar{x} \pm \sigma$)	T0 ($\bar{x} \pm \sigma$)	T24 ($\bar{x} \pm \sigma$)	T0 ($\bar{x} \pm \sigma$)	T24 ($\bar{x} \pm \sigma$)
95/05	1,04±0,00	0,25±0,00	1,61±0,08	0,15±0,05	0,68±0,01	1,21±0,24
90/10	1,13±0,00	0,26±0,00	2,04±0,00	0,11±0,03	2,21±0,04	0,66±0,40
80/20	1,53±0,06	0,30±0,00	2,96±0,02	0,28±0,28	3,30±0,09	0,65±0,66
70/30	1,41±0,01	0,31±0,04	2,68±0,04	0,30±0,21	3,25±0,04	1,57±0,22
60/40	1,57±0,03	0,3±0,06	3,49±0,08	0,30±0,07	2,69±0,03	1,47±0,53
50/50	2,11±0,03	0,35±0,10	3,89±0,00	0,30±0,09	3,18±0,08	1,89±0,17
40/60	2,41±0,00	0,41±0,02	3,74±0,00	0,47±0,20	4,37±0,16	1,17±0,62
30/70	3,05±0,01	0,40±0,07	4,09±0,01	0,60±0,02	3,87±0,02	1,59±0,87
20/80	2,90±0,00	0,52±0,03	3,85±0,04	0,47±0,12	3,84±0,03	0,93±0,10
10/90	1,95±0,28	0,33±0,03	3,83±0,02	0,69±0,03	4,10±0,01	1,08±0,07
05/95	4,48±0,28	0,74±0,05	4,04±0,01	0,75±0,01	4,41±0,01	0,68±0,08

Legenda: \bar{x} – média; σ – desvio padrão

Tabela 9: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para a *S. cerevisiae*.

Proporção solvente/cultura	DMSO	Metanol	Hexano
	95/05	24,42 %	9,77 %
90/10	23,67 %	5,63 %	30,02 %
80/20	19,51 %	9,49 %	19,92 %
70/30	22,50 %	11,29 %	48,46 %
60/40	21,78 %	8,69 %	54,78 %
50/50	16,92 %	7,88 %	59,56 %
40/60	17,00 %	12,65 %	26,79 %
30/70	13,19 %	14,76 %	41,23 %
20/80	17,92 %	12,22 %	24,32 %
10/90	17,33 %	17,99 %	26,36 %
05/95	16,69 %	18,74 %	15,58 %

Nas tabelas 10 e 11 estão representados os resultados do ensaio de toxicidade para o *E. coli* 25922. Após análise dos resultados verifica-se que o hexano é o solvente menos tóxico apresentando percentagens de crescimento entre os 39 e os 78%. Obtendo-se após incubação a média e o desvio padrão de $1,25 \pm 0,06$. Para esta estirpe, o DMSO e o metanol apresentaram percentagens de crescimento idênticas. O metanol com a média e o desvio padrão de $1,06 \pm 0,07$ na proporção de 20/80. Finalmente, o DMSO com a média e o desvio padrão de $0,72 \pm 0,02$ na proporção de 05/95.

Tabela 10: Resultados do ensaio de toxicidade para *E. coli* 25922.

Proporção solvente/cultura	DMSO		Metanol		Hexano	
	T0 ($x \pm \sigma$)	T24 ($x \pm \sigma$)	T0 ($x \pm \sigma$)	T24 ($x \pm \sigma$)	T0 ($x \pm \sigma$)	T24 ($x \pm \sigma$)
95/05	1,04 \pm 0,01	0,40 \pm 0,00	0,78 \pm 0,00	0,29 \pm 0,02	1,09 \pm 0,01	0,61 \pm 0,11
90/10	1,13 \pm 0,01	0,39 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,36 \pm 0,00	1,26 \pm 0,01	0,70 \pm 0,21
80/20	1,17 \pm 0,02	0,41 \pm 0,03	1,13 \pm 0,00	0,37 \pm 0,02	1,36 \pm 0,00	0,52 \pm 0,12
70/30	1,21 \pm 0,00	0,31 \pm 0,08	1,30 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01	1,44 \pm 0,00	0,74 \pm 0,12
60/40	1,05 \pm 0,01	0,33 \pm 0,04	1,60 \pm 0,03	0,42 \pm 0,04	1,54 \pm 0,00	1,09 \pm 0,09
50/50	0,95 \pm 0,00	0,26 \pm 0,02	1,57 \pm 0,02	0,47 \pm 0,00	1,60 \pm 0,00	1,25 \pm 0,06
40/60	1,00 \pm 0,00	0,33 \pm 0,01	1,70 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01	1,69 \pm 0,00	1,17 \pm 0,05
30/70	1,16 \pm 0,00	0,38 \pm 0,04	1,70 \pm 0,00	0,48 \pm 0,01	1,69 \pm 0,00	1,08 \pm 0,03
20/80	1,31 \pm 0,00	0,45 \pm 0,01	1,93 \pm 0,02	0,42 \pm 0,03	1,84 \pm 0,01	1,16 \pm 0,07
10/90	1,58 \pm 0,00	0,56 \pm 0,01	1,89 \pm 0,01	1,06 \pm 0,07	2,19 \pm 0,00	1,13 \pm 0,08
05/95	1,79 \pm 0,00	0,72 \pm 0,02	2,07 \pm 0,00	1,09 \pm 0,00	2,33 \pm 0,00	1,10 \pm 0,12

Legenda: x – média; σ – desvio padrão

Tabela 11: Resultados em percentagem do ensaio de toxicidade para a *E. coli* ATCC 25922.

Proporção solvente/cultura	DMSO	Metanol	Hexano
95/05	38,54 %	37,58 %	56,48 %
90/10	34,83 %	36,96 %	55,76 %
80/20	35,44 %	32,76 %	38,76 %
70/30	25,86 %	30,62 %	51,58 %
60/40	31,64 %	26,65 %	71,22 %
50/50	28,36 %	30,48 %	78,15 %
40/60	33,60 %	26,31 %	69,69 %
30/70	33,42 %	28,37 %	64,20 %
20/80	34,95 %	21,79 %	63,25 %
10/90	35,91 %	55,99 %	51,61 %
05/95	40,15 %	52,86 %	47,18 %

Nas tabelas 12 e 13 apresentam-se os resultados do ensaio de toxicidade para o isolado S3R9. Os resultados dos ensaios com DMSO e metanol surgem com percentagens de crescimento entre os 12 e 32% e 14-21%, respetivamente. O metanol com a média e o desvio padrão de $0,46 \pm 0,06$ na proporção de 20/80 foi considerado o solvente com toxicidade intermédia. Já o DMSO com a média e o desvio padrão de $0,37 \pm 0,02$ na proporção de 20/80 é o solvente mais tóxico. Pode, assim, indicar-se que hexano é o solvente menos tóxico, visto que se verificou menor toxicidade nas mesmas proporções de solvente/cultura em μL (50/50), obtendo-se a média e o desvio padrão de $1,94 \pm 0,06$.

Tabela 12: Resultados do ensaio de toxicidade para o isolado S3R9.

Proporção solvente/cultura	DMSO		Metanol		Hexano	
	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)	T0 (x±σ)	T24 (x±σ)
95/05	1,44±0,03	0,25±0,02	0,74±0,02	0,16±0,12	1,43±0,10	1,30±0,39
90/10	1,47±0,03	0,24±0,04	1,11±0,01	0,17±0,13	1,35±0,04	2,27±0,37
80/20	1,98±0,02	0,27±0,01	1,25±0,02	0,15±0,10	2,38±0,02	0,71±0,87
70/30	1,77±0,03	0,26±0,09	1,45±0,01	0,17±0,10	2,32±0,01	1,78±0,22
60/40	1,75±0,02	0,33±0,01	1,76±0,01	0,27±0,20	2,60±0,01	0,94±0,74
50/50	1,80±0,04	0,27±0,10	1,77±0,01	0,26±0,16	2,50±0,01	1,94±0,06
40/60	1,71±0,02	0,35±0,03	1,84±0,01	0,32±0,10	2,35±0,01	0,91±0,03
30/70	1,83±0,03	0,29±0,13	2,10±0,01	0,36±0,06	2,41±0,00	0,93±0,05
20/80	2,37±0,01	0,37±0,02	2,37±0,01	0,46±0,06	2,91±0,02	0,79±0,07
10/90	2,44±0,03	0,33±0,08	2,98±0,02	0,80±0,04	3,06±0,00	0,89±0,01
05/95	2,96±0,07	0,57±0,03	3,03±0,02	0,98±0,03	3,19±0,01	0,94±0,08

Legenda: X – média; σ – desvio padrão

Tabela 13: Resultados em percentagem de toxicidade para o isolado S3R9

Proporção solvente/cultura	DMSO	Metanol	Hexano
95/05	17,85 %	21,88 %	90,44 %
90/10	16,27 %	15,15 %	16,86 %
80/20	13,95 %	11,97 %	29,87 %
70/30	14,76 %	11,78 %	76,68 %
60/40	18,41 %	15,56 %	36,45 %
50/50	15,46 %	14,60 %	77,58 %
40/60	20,77 %	17,50 %	38,78 %
30/70	16,29 %	17,21 %	38,88 %
20/80	15,51 %	19,66 %	27,45 %
10/90	13,78 %	26,87 %	29,19 %
05/95	19,35 %	32,36 %	29,68 %

Nas tabelas 14 e 15 estão representados os resultados do ensaio de toxicidade para o isolado S3R22. O hexano é, novamente, o solvente menos tóxico, apresentando maiores percentagens de crescimento (39-83%). Verificou-se menor toxicidade nas mesmas proporções de solvente/cultura (50/50), obtendo-se a média e o desvio padrão de 2,08±0,77. O DMSO, com a média e o desvio padrão de 0,50±0,07 na proporção de 20/80, apresentou percentagens menores de crescimento (19-31%). Enquanto, o metanol, com a

média e o desvio padrão de $0,63 \pm 0,03$ na proporção de 20/80, é o solvente com toxicidade intermédia, exibindo entre 14 e 43% de crescimento.

Tabela 14: Resultados do ensaio de toxicidade para o isolado S3R22.

Proporção solvente/cultura	DMSO		Metanol		Hexano	
	T0 ($x \pm \sigma$)	T24 ($x \pm \sigma$)	T0 ($x \pm \sigma$)	T24 ($x \pm \sigma$)	T0 ($x \pm \sigma$)	T24 ($x \pm \sigma$)
95/05	1,22±0,01	0,32±0,00	0,80±0,01	0,21±0,05	1,83±0,12	3,29±0,05
90/10	1,37±0,01	0,33±0,00	1,01±0,02	0,18±0,09	2,57±0,07	2,14±1,21
80/20	1,39±0,01	0,33±0,10	1,37±0,01	0,25±0,03	2,42±0,01	2,30±0,10
70/30	1,52±0,01	0,42±0,00	1,61±0,01	0,21±0,04	2,37±0,01	1,71±1,14
60/40	1,38±0,01	0,38±0,12	1,78±0,03	0,27±0,02	2,44±0,01	2,08±0,77
50/50	1,46±0,05	0,46±0,01	2,06±0,05	0,28±0,06	2,52±0,01	1,90±0,72
40/60	1,43±0,01	0,37±0,10	2,59±0,04	0,52±0,07	2,68±0,02	1,19±0,07
30/70	1,73±0,00	0,45±0,08	2,49±0,03	0,50±0,04	2,67±0,01	1,21±0,08
20/80	2,00±0,01	0,50±0,07	2,84±0,04	0,63±0,03	2,87±0,02	1,11±0,08
10/90	2,44±0,01	0,45±0,22	2,86±0,01	1,23±0,17	2,96±0,01	1,12±0,13
05/95	3,04±0,01	0,67±0,13	3,07±0,01	1,25±0,07	3,15±0,03	1,26±0,02

Legenda: X – média; σ – desvio padrão

Tabela 15: Resultados em percentagem de toxicidade para o isolado S3R22

Proporção solvente/cultura	DMSO	Metanol	Hexano
95/05	26,64 %	26,68 %	79,82 %
90/10	24,54 %	17,98 %	83,23 %
80/20	24,17 %	18,19 %	95,30 %
70/30	27,84 %	13,30 %	72,15 %
60/40	27,50 %	15,62 %	85,27 %
50/50	31,52 %	13,73 %	75,35 %
40/60	25,80 %	20,12 %	44,52 %
30/70	26,23 %	20,05 %	45,32 %
20/80	25,01 %	22,39 %	38,94 %
10/90	18,76 %	43,05 %	38,11 %
05/95	22,20 %	40,63 %	39,95 %

4. Determinação da sensibilidade das estirpes aos extratos

Na tabela 16 estão apresentados os resultados para a sensibilidade da *E. coli*. Verifica-se que os extratos destilado e bruto com maior atividade são os de metanol, seguido da água e do DMSO. O extrato destilado de hexano não exerce qualquer efeito nesta bactéria, enquanto o extrato bruto tem efeito mínimo (próximo de 100%).

Tabela 16: Determinação da sensibilidade da *E. coli* aos extratos.

Solventes	Extratos destilados	Extrato bruto
	%	%
Água	54,04	47,73
Hexano	105,27	93,10
Metanol	50,50	39,98
DMSO	68,19	49,30

Na tabela 17 estão representados os resultados da sensibilidade para os isolados S3R9 e S3R22. Verifica-se que os extratos destilado e bruto com maior atividade são os de metanol, seguido da água e do DMSO. O extrato destilado de hexano no extrato bruto do isolado S3R22 não exerce qualquer efeito nesta bactéria, enquanto os extratos destilados têm um efeito mínimo (próximo de 100%).

Tabela 17: Determinação da sensibilidade para os isolados S3R9 e S3R22.

Extratos	S3R9		S3R22	
	Extrato destilado	Extrato bruto	Extrato destilado	Extrato bruto
	%	%	%	%
Água	17,94	46,05	90,94	92,83
Hexano	23,06	70,84	96,58	101,36
Metanol	1,66	16,38	90,05	70,18
DMSO	84,26	55,80	84,83	75,62

Na tabela 18 estão representados os resultados da sensibilidade para o *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* MRSA. Verifica-se que os extratos destilado e bruto com maior atividade são os de água, seguido do hexano e do DMSO e finalmente do metanol. O extrato destilado de hexano e de metanol do *S. aureus* MRSA têm um efeito mínimo (próximo de 100%).

Tabela 18: Determinação da sensibilidade para o *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* MRSA

Extratos	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>S. aureus</i> MRSA	
	Extrato destilado	Extrato bruto	Extrato destilado	Extrato bruto
	%	%	%	%
Água	40,80	55,58	57,13	71,85
Hexano	60,14	66,67	96,08	33,88
Metanol	86,23	5,14	96,78	56,14
DMSO	82,55	1,57	0,03	18,65

A tabela 19 apresenta os resultados para a sensibilidade da *S. cerevisiae*, onde se verifica que os extratos destilado e bruto com maior atividade são os de DMSO, seguido da água e do metanol e do hexano. O extrato bruto do hexano não exerce qualquer efeito nesta bactéria.

Tabela 19: Determinação da sensibilidade para o *S. cerevisiae*.

Solventes	Extratos destilados	Extrato bruto
	%	%
Água	53,58	53,35
Hexano	82,42	102,41
Metanol	74,47	73,65
DMSO	1,64	52,03

Discussão e conclusão

As plantas são comumente usadas no desenvolvimento de medicamentos através do conhecimento dos compostos que as constituem. Atualmente, vários produtos químicos distintos derivados de plantas são empregues como medicamentos, sendo usados em vários países ⁷.

Atualmente existem vários estudos no âmbito da descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e de outros produtos naturais. Com este trabalho pretendeu-se verificar a atividade antimicrobiana de extratos orgânicos e aquosos da raiz do borututu de forma a ser possível usar-se esta raiz com fins medicinais.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode concluir-se que os extratos da planta do borututu contêm componentes com poder inibitório para as estirpes estudadas, nomeadamente *S. cerevisiae* ATCC 9763, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* MRSA, *E. coli* ATCC 25922 e isolados ambientais do grupo de trabalho, identificados por S3R9 e S3R22 (bastonetes Gram-negativos).

Para todos os microrganismos utilizados neste estudo foram traçadas as respetivas curvas de crescimento, de forma a determinar qual a fase logarítmica de cada um. Segundo a bibliografia analisada, a fase logarítmica é a melhor fase em que se deve proceder à inoculação dos microrganismos, uma vez que, nesta fase os microrganismos encontram-se na sua fase de duplicação exponencial. Analisando os resultados obtidos para o crescimento bacteriano, concluímos que para a *E. coli* ATCC 25922, isolados S3R9 e S3R22 o ponto médio da fase logarítmica 75 minutos de incubação; e, para a *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* MRSA são 125 minutos. Quanto à levedura *S. cerevisiae* são necessárias 6 horas, para o atingimento do ponto médio da fase logarítmica.

Os testes de sensibilidade mostraram-se inconclusivos, com exceção dos extratos aquosos, que mostraram inibição das estirpes em estudo. No entanto, visto que o controlo não inibiu podemos concluir que os extratos aquosos do borututu possuem capacidade inibitória.

Os ensaios para avaliar a toxicidade dos solventes orgânicos utilizados foram realizados com o objetivo de saber se os solventes utilizados induziam alguma forma de toxicidade às estirpes em estudo. De acordo com os resultados dos ensaios de toxicidade dos solventes, conclui-se que o hexano é o solvente menos tóxico, visto que se verificou o maior crescimento nas mesmas proporções de solvente/cultura, na proporção de 50/50, e

menor rendimento de extração, seguindo o metanol e o DMSO mostrou-se o mais tóxico visto que na proporção de 05/95 foi o que mostrou menor crescimento. Assim conclui-se que entre os solventes utilizados do estudo o hexano, é solvente com maior capacidade de induzir maior toxicidade.

Os resultados da viabilidade dos extratos indicam-nos que os extratos do borututu possuem componentes com capacidade de reduzir o crescimento microbiológico. Ao comparar os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e orgânicos utilizando-se o método de difusão em ágar, observou-se que houve diferença entre as metodologias de difusão em ágar analisadas, sendo que o ensaio de difusão em agar demonstrou melhor desempenho, já que houve inibição da maioria das estirpes testadas. Embora esta tenha sido a melhor técnica de difusão observada neste estudo, pode-se considerar que o método de microdiluição em caldo foi a melhor opção para determinar a atividade antimicrobiana, por fornecer dados quantitativos, além de ser mais confiável e económico para determinar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais.

Foram várias as limitações encontradas, quer no facto de haver pouca literatura disponível e no decorrer da tese a ocorrência de evaporação dos solventes nos ensaios de toxicidade, algumas dificuldades em encontrar um padrão para o teste de sensibilidade. O método de placa de 96 poços, possui alguns inconvenientes, tais como as células de alguns microrganismos aderirem à base do poço, ou permanecerem em suspensão, alguns compostos presentes em alguns extratos podem precipitar. Todavia, é um método barato, tem reprodutibilidade, é sensível, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente ³⁵.

Face ao sinergismo que o borututu apresenta, urge a necessidade de mais estudos de avaliação dos componentes com potencial verdadeiro e colocá-los ao serviço da indústria farmacêutica.

Em suma, num futuro próximo, a engenharia metabólica e as abordagens biotecnológicas podem ser usadas como sistemas de produção alternativos para superar a disponibilidade limitada de compostos de metabolitos secundários de plantas biologicamente ativos, comercialmente valiosos e com vastas aplicações medicinais. Neste campo, impõe-se a produção biotecnológica controlada e bem-sucedida de produtos químicos extraídos de vegetais, com potencial valioso e, muito provavelmente, ainda desconhecido.

Bibliografia

1. Duarte, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência* **7**, 16 (2006).
2. Barreira, J. C. M., Morais, A. L., Ferreira, I. C. F. R. & Oliveira, M. B. P. P. Insights on the formulation of herbal beverages with medicinal claims according with their antioxidant properties. *Molecules* **18**, 2851–2863 (2013).
3. Favarin, D. C., de Oliveira, J. R., de Oliveira, C. J. F. & Rogerio, A. de P. Potential effects of medicinal plants and secondary metabolites on acute lung injury. *Biomed Res. Int.* **2013**, 576479 (2013).
4. Amoa Onguéné, P. *et al.* The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part I: a pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. *Malar. J.* **12**, 4–25 (2013).
5. WHA. *MEDICINA TRADICIONAL Y PLANTAS MEDICINALES.* (1988).
6. Urso, V., Signorini, M. A., Tonini, M. & Bruschi, P. Wild medicinal and food plants used by communities living in Mopane woodlands of southern Angola: *J. Ethnopharmacol.* **177**, 126–139 (2016).
7. Hussain, M. S. *et al.* Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **4**, 10 (2012).
8. Yao, J., Weng, Y., Dickey, A. & Wang, K. Y. Plants as factories for human pharmaceuticals: Applications and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 28549–28565 (2015).
9. Sousa, F. C. F. *et al.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Brazilian J. Pharmacogn.* **18**, 642–654 (2008).
10. Pereira, C. *et al.* Effects of gamma radiation on chemical and antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of borututu. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **26**, 271–277 (2014).
11. Abourashed, E. & Fu, H. Hydroxybenzoic Acids Are Significant Contributors to the Antioxidant Effect of Borututu Bark, *Cochlospermum angolensis* Welw. ex Oliv. *Antioxidants* **6**, 9 (2017).
12. Vogel, P. *et al.* Polyphenols Benefits of Olive Leaf (*Olea Europaea* L) To Human Health. *Nutr. Hosp.* **31**, 1427–1433 (2015).
13. Sanfilippo, M. *Trinta árvores e arbustos do miombo angolano. Guia de campo para a identificação.* COSPE Firenze. (2014).
14. E, M. S. & A, M. E. M. *Cochlospermaceae.* (2003).

15. Hislop, M., Thiele, K. R. & Brassington, D. *Cochlospermum macnamarae* (Bixaceae), a rare, new endemic from the Pilbara bioregion of Western Australia. *J. West. Aust. Herb.* 89–94 (2013).
16. Sánchez-Salgado, J. C., Castillo-España, P., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R. & Estrada-Soto, S. *Cochlospermum vitifolium* induces vasorelaxant and antihypertensive effects mainly by activation of NO/cGMP signaling pathway. *J. Ethnopharmacol.* **130**, 477–484 (2010).
17. Ferreres, F., Grosso, C., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P. & Andrade, P. B. Ellagic acid and derivatives from *cochlospermum angolensis* welw. *Phytochem. Anal.* **24**, 534–540 (2013).
18. Pereira, C., Calhella, R. C., Barros, L. & Ferreira, I. C. F. R. Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. *Ind. Crops Prod.* **49**, 61–65 (2013).
19. Sashidhar, R. B. *et al.* Bioprospecting of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*) for bioremediation of uranium (VI) from aqueous solution and synthetic nuclear power reactor effluents. *J. Environ. Radioact.* **148**, 33–41 (2015).
20. Vinha, A. F., Costa, A., Soares, M. & Pires, P. Atividade antioxidante de extratos aquosos de *Cochlospermum angolense* (Borututu). in 2–5 (2012).
21. Inngjerdingen, K. T. *et al.* A comparison of bioactive aqueous extracts and polysaccharide fractions from roots of wild and cultivated *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. *Phytochemistry* **93**, 136–143 (2013).
22. Ahmed, T., Magaji, M., Yaro, A., Musa, A. & Adamu, A. Aqueous Methanol Extracts of *Cochlospermum tinctorium* (A. Rich) Possess Analgesic and Anti-inflammatory Activities. *J. Young Pharm.* **3**, 237–42 (2011).
23. Vinod, V. T. P., Saravanan, P., Sreedhar, B., Devi, D. K. & Sashidhar, R. B. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **83**, 291–298 (2011).
24. Andrade, L. S., Santos, D. B., Castro, D. B., Guillo, L. a & Chen-Chen, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.* **68**, 155–159 (2008).
25. Coisin, M., Burzo, I., Tefan, M. Ş., Rosenhech, E. & Zamfirache, M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of. *PJBS-Pakistan J. Biol. Sci.* 51–58 (2012).

26. Pereira, C. *et al.* Phenolic profile and antimicrobial activity of different dietary supplements based on *Cochlospermum angolensis* Welw. *Ind. Crops Prod.* **74**, 412–416 (2015).
27. Pino, Oriela, Sánchez, Yaíma, & Rojas, M. M. Plant secondary metabolites as an alternative in pest management. I: Background, research approaches and trends. *Rev. Protección Veg.* **28**(2), 81-94. (2013).
28. Calcagno, C., Lobatto, M. E., Robson, P. M. & Millon, A. Biocuration at the Saccharomyces Genome Database. **28**, 1304–1314 (2016).
29. Soares, D. G., Andreazza, A. C. & Salvador, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **41**, 95–100 (2005).
30. Wang, L., Fan, D., Chen, W. & Terentjev, E. M. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci. Rep.* **5**, 15159 (2015).
31. Paradiso, V. M., Clemente, A., Summo, C., Pasqualone, A. & Caponio, F. Extraction of phenolic compounds from extra virgin olive oil by a natural deep eutectic solvent: Data on UV absorption of the extracts. *Data Br.* **8**, 553–556 (2016).
32. Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375 (2013).
33. Bona, E. A. M. De, Pinto, F. G. da S., Fruet, T. K., Jorge, T. C. M. & Moura, A. C. de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. **81**, 218–225 (2014).
34. Laborclin. Manual para Antibiograma, difusão em Disco (Kirby & Bauer). 1–29 (2011).
35. Campana, E. H. *et al.* Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **47**, 157–164 (2011).
36. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **6**, 71–79 (2016).