



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

Estabelecimento *in vitro*, caracterização
fitoquímica e bioatividade de extratos de *Tuberaria
lignosa*

Luís Miguel Valente Lavoura

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

Orientador: Professor Doutor Marcos Nopper Alves
Co-orientadores: Professora Doutora Fernanda Domingues
Doutor Ângelo Filipe Santos Luís

Covilhã, Outubro de 2018

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

Ao meu pai que me passou os princípios e os valores necessários para enfrentar a vida com dignidade e integridade.

À minha melhor amiga e conselheira, a minha mãe, pelo seu amor e pela sua dedicação incondicional em que eu me tornasse aquilo que sou;

Ao meu irmão, pelos conselhos e pelo apoio sempre demonstrado.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmão, por todo o tipo de apoio, seja ele financeiro ou emocional, por se disponibilizarem em qualquer momento, para qualquer ajuda e pela efetiva participação neste trabalho e em toda a minha formação.

Aos meus avós pelo carinho demonstrado e por toda a força que me foi dada ao longo da minha vida e do meu percurso acadêmico.

À minha namorada pelo amor, companheirismo, paciência e amizade demonstrados.

Aos meus amigos por estarem sempre presentes quando necessário.

Ao Professor Doutor Marcos Nopper Alves pela orientação, ensinamentos e confiança que se demonstraram essenciais no desenvolvimento desta investigação.

Ao Professor Doutor Clayton Debiasi pela fulcral ajuda na área da micropropagação.

À Doutora Teresa Delgado pela ajuda prestada na parte da fitoquímica e tratamento de resultados.

À Professora Doutora Fernanda Domingues pela exigência e por esperar sempre mais de mim.

Ao Doutor Ângelo por todo o apoio demonstrado tanto na investigação, como na formulação da tese, tendo sido incansável no apoio prestado.

Resumo

As plantas medicinais são um recurso cada vez mais procurado em diversas indústrias devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. A *Tuberaria lignosa* (tradicionalmente conhecida como Erva Loba) é uma planta medicinal da família *Cistaceae*, rasteira e de flor amarela e está muito presente em pinhais e zonas áridas, nas regiões do Nordeste Português. As folhas da *Tuberaria lignosa* são uma fonte de compostos fenólicos, elagitaninos, flavonoides, açúcares e ácido ascórbico. Tem também uma ação inibitória da transcriptase reversa do HIV-1. A micropropagação de plantas é um processo importante para produzir plantas de interesse sem implicações ambientais. Desta forma é importante interligar métodos de análise de propriedades de interesse em plantas com a sua produção e comercialização de forma ininterrupta, rentável, sanificada e sem colocar em causa a extinção de espécies. Neste trabalho foram efetuadas sete tipos de extrações a partir de folhas frescas de *Tuberaria lignosa* (hidrodestilação, infusão, decocção, metanol 100%, etanol 96%, etanol 50% e n-Hexano) e uma a partir das flores (hidrodestilação), para posteriores testes antioxidantes (DPPH, Poder Redutor), Capacidade Redutora Total e antimicrobianos (difusão em disco e determinação dos valores da concentração mínima inibitória). Paralelamente foi iniciado um ensaio de multiplicação *in vitro*, pioneiro para esta espécie. Em conclusão, os extratos de *Tuberaria lignosa* demonstram ter propriedades interessantes sob o ponto de vista de atividade antioxidante, tendo as extrações aquosas demonstrado melhores resultados nos testes realizados. A nível antimicrobiano, o extrato da hidrodestilação das folhas apresenta um valor de MIC de 0.0195 mg/mL para a *Candida albicans* ATCC 90028 e para a *Candida tropicalis* ATCC 750, o que revela uma ligeira atividade sobre estas leveduras. O ensaio de multiplicação demonstrou que a luz LED tem uma forte influência no crescimento dos explantes e multiplicação da *Tuberaria lignosa*.

Palavras-chave

Tuberaria lignosa, multiplicação *in vitro*, antioxidantes, DPPH, poder redutor, capacidade redutora total, efeito antimicrobiano, difusão em disco, resazurina.

Abstract

Medicinal plants are a resource increasingly sought in various industries due to its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Tuberaria lignosa* (traditionally known as Erva Loba) is a medicinal ground plant of the family *Cistaceae* presenting yellow flower, which is often present in pine forests and arid zones in the regions of Northeast of Portugal. *Tuberaria lignosa* leaves are a source of phenolic compounds, elagitanins, flavonoids, sugars and ascorbic acid. It also presents an inhibitory action on HIV-1 reverse transcriptase. Micropropagation of plants is an important process to produce plants of interest without environmental implications. In this way, it is important to interconnect methods of analysis of properties of interest in plants with their production in an uninterrupted, profitable and sanitized way, together with the prevention of the extinction of species. In this work, seven types of extractions were performed from fresh leaves of *Tuberaria lignosa* (hydrodistillation, infusion, decoction, 100% methanol, 96% ethanol, 50% ethanol and n-Hexane) and one from flowers (hydrodistillation) to perform antioxidant tests (DPPH, Reduction Power), Total Reducing Capacity and antimicrobial activity evaluation (disk diffusion and determination of minimum inhibitory concentration). In parallel, a pioneering *in vitro* multiplication assay was started for this species. In conclusion, *Tuberaria lignosa* showed interesting antioxidant properties, with aqueous extracts showing better results in the tests performed. Regarding the antimicrobial tests, leaves hydrodistillation extract has a MIC value of 0.0195 mg/mL for *Candida albicans* ATCC 90028 and for *Candida tropicalis* ATCC 750, which reveals a slight activity on these yeasts. The multiplication test demonstrated that LED light has a strong influence on explant growth and multiplication of *Tuberaria lignosa*.

Keywords

Tuberaria lignosa, *in vitro* multiplication, antioxidants, DPPH, reducing power, reducing capacity, antimicrobial effect, disk diffusion, resazurin.

Índice

Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1. Plantas medicinais	2
1.2. <i>Cistaceae</i>	2
1.3. <i>Tuberaria lignosa</i>	3
1.4. Cultura de células vegetais	3
1.4.1. Micropropagação <i>in vitro</i>	4
1.4.2. Escolha do material vegetal.....	5
1.4.3. Desinfecção do material vegetal	5
1.4.5. Estabelecimento	6
1.4.6. Multiplicação	6
1.5. Extração de compostos bioativos.....	6
1.5.1. Hidrodestilação.....	7
1.5.2. Infusão e decocção.....	7
1.5.3. Extrações por solventes orgânicos.....	8
1.6. Capacidade Redutora Total.....	8
1.7. Propriedades antioxidantes em plantas.....	8
1.7.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	9
1.7.2. Poder redutor.....	10
1.8. Propriedades antimicrobianas em plantas.....	10
1.8.1. Método da difusão em disco	11
1.8.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	11
1.9. Objetivos.....	11
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	13
2.1. Colheita do material vegetal	13
2.2. Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i>	13
2.2.1. Desinfecção do material	13
2.2.2. Estabelecimento	13
2.2.3. Multiplicação	13
2.3. Extrações aquosas.....	14
2.3.1. Hidrodestilação Clevenger	14
2.3.2. Infusão.....	15
2.3.3. Decocção	15
2.3. Extração por solventes orgânicos	15
2.3.1 Extração Etanol 96%.....	15
2.3.2 Extração com etanol 50%.....	15
2.3.3 Extração com metanol 100%.....	16
2.5. Capacidade redutora total.....	16

2.6. Atividade antioxidante	17
2.6.1 DPPH.....	17
2.6.2 Poder redutor.....	17
2.7. Avaliação da atividade antimicrobiana	17
2.7.1. Estirpes de microrganismos e meios de cultura	17
2.7.2. Teste de difusão em disco	18
2.7.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	19
2.8. Análise estatística	19
Capítulo 3-Resultados e Discussão.....	21
3.1. Micropropagação <i>in vitro</i>	21
3.1.1. Multiplicação <i>in vitro</i> da <i>Tuberaria lignosa</i>	21
3.2. Estudos fitoquímicos	28
3.2.1. DPPH	28
3.2.2. Poder redutor	30
3.2.3. Capacidade Redutora Total	32
3.3. Testes antimicrobianos	33
3.3.1. Teste da difusão em disco	33
3.3.2. Concentração Mínima Inibitória (MIC)	36
Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras	39
Bibliografia	41

Lista de Figuras

Figura 1 - *Tuberaria lignosa* no meio natural;

Figura 2 - Conversão do radical livre DPPH em DPPH-H na presença de uma molécula antioxidante;

Figura 3 - Relação entre novos rebentos formados e o tipo de tratamento no primeiro e no segundo ciclo;

Figura 4 - Análise dos rebentos formados no primeiro e segundo ciclo;

Figura 5 - Explantes de *Tuberaria lignosa in vitro* após 45 dias de cultivo no tratamento 5;

Figura 6 - Relação entre o crescimento dos explantes (cm) com os diferentes tratamentos;

Figura 7 - Análise do crescimento dos explantes (cm) no primeiro e segundo ciclo.

Figura 8 - Crescimento das plantas após 45 dias de cultivo no tratamento 5;

Figura 9 - Relação entre a % de plantas necróticas com o tratamento utilizado no primeiro ciclo e no segundo ciclo reprodutivo;

Figura 10 - Análise da % de mortes necróticas com o tratamento utilizado no primeiro e no segundo ciclo.

Figura 11 - Exemplos de plantas *in vitro* com clorose no 1º ciclo de 45 dias de cultivo no tratamento 9;

Figura 12 - Exemplos de plantas *in vitro* com necrose após o segundo ciclo no tratamento 9;

Figura 13 - Amostras de extratos no ensaio DPPH antes da leitura no espectrofotómetro;

Figura 14 - Relação do EC₅₀ no ensaio DPPH com os diferentes extratos;

Figura 15 - Relação entre o EC₅₀ e os diferentes extratos no Poder Redutor;

Figura 16 - Relação entre a Capacidade Redutora Total nos diferentes extratos expressos em equivalentes de ácido gálico;

Figura 17 - Reagente Follin-Ciocalteu no teste da Capacidade Redutora Total;

Figura 18 - Ensaio de microtitulação de resazurina.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Meio Murashige e Skoog adaptado de ([27]);

Tabela 2- Exemplo de alguns compostos bioativos extraídos por diferentes solventes (adaptado de [2]);

Tabela 3 - Ensaio de multiplicação da *Tuberaria lignosa*;

Tabela 4 - Estirpes utilizadas nos ensaios antimicrobianos;

Tabela 5 - Média dos rebentos formados no primeiro e segundo ciclo para os diferentes tratamentos;

Tabela 6 - Média do crescimento do explante mãe (em cm) no primeiro e segundo ciclo para os diferentes tratamentos;

Tabela 7 - Média da % de plantas necróticas com o tratamento utilizado no primeiro ciclo e no segundo ciclo reprodutivo;

Tabela 8 - Valores de EC_{50} no ensaio DPPH, em μg de extrato/mL, ($p < 0.05$);

Tabela 9 - Valores de EC_{50} descritos em μg de extrato/mL no ensaio do Poder Redutor, ($p < 0.05$);

Tabela 10 - Valores da Capacidade Redutora Total em mmol/g de equivalentes de Ácido gálico/g de extrato;

Tabela 11 - Diâmetro de inibição em mm difusão em disco, (** $p < 0.05$, comparativamente ao controlo positivo e ao controlo negativo, * $p < 0.05$ comparativamente ao controlo positivo);

Tabela 12 - Valores do MIC no ensaio de microdiluição com a resazurina, (** $p < 0.05$ comparativamente ao controlo positivo e ao controlo negativo).

Lista de Acrónimos

HIV	Vírus da imunodeficiência Humana;
<i>T. lignosa</i>	<i>Tuberaria lignosa</i> ;
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila;
FeCl ₃	Cloreto de ferro;
MIC	Concentração mínima inibitória;
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute;
IAA	Ácido Indolacético;
BAP	6-benzilaminopurina;
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico;

Capítulo 1 - Introdução

A natureza é uma fonte muito diversificada de plantas medicinais com propriedades de interesse, utilizadas desde os inícios da civilização humana [1]. Como noutras partes da Europa, o conhecimento da medicina tradicional foi naturalmente ultrapassado pelos avanços da medicina. O uso de plantas medicinais no tratamento do cancro tem uma longa história. As plantas eram consideradas um recurso primário para a produção de compostos tradicionalmente utilizados contra o cancro. Muitos investigadores têm descrito inúmeras espécies de plantas medicinais, que têm sido utilizadas no tratamento de patologias desde os tempos antigos e, hoje em dia, a tendência para a sua utilização é cada vez maior [2]. A utilização de plantas medicinais em diversos tratamentos pode causar a diminuição da incidência de diferentes doenças devido aos seus efeitos protetores contra alguns danos oxidativos e inflamatórios. As folhas de diversas plantas são tradicionalmente usadas no tratamento de cancro, hipertensão, diabetes e doenças associadas a reumatismo, inflamação, dor de cabeça e dermatite atópica. Nestes efeitos, não existem muitos estudos que confirmem essas ações terapêuticas, o que destaca a importância de uma maior pesquisa com o objetivo de aumentar a caracterização farmacológica e toxicológica de plantas [3].

A utilização intensiva de antibióticos criou um desafio sem precedentes para a civilização humana, devido ao desenvolvimento de microrganismos com resistências antimicrobianas. Existe uma preocupação crescente no número de surtos de doenças causadas por alguns microrganismos patogénicos, que podem ser transmitidas por alimentos. Este problema associado à resistência cada vez maior de alguns microrganismos a antibióticos, desperta o interesse da indústria e da investigação no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos eficazes e seguros, preferencialmente derivados de fontes naturais como as plantas [4]. É difícil tratar infeções bacterianas devido à resistência contra alguns agentes antimicrobianos. Os agentes antimicrobianos são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação que pode ir desde a inibição da síntese da parede celular, síntese de DNA e RNA, lise da membrana bacteriana, inibição da síntese proteica e inibição de vias metabólicas.

Atualmente, o tratamento clinicamente disponível não é eficaz contra a resistência desenvolvida por algumas espécies bacterianas a antibióticos. No entanto, os agentes antimicrobianos à base de plantas têm um grande potencial para combater doenças bacterianas e fúngicas [5]. A epidemiologia de alguns microrganismos mudou ao longo dos anos. Infeções que anteriormente eram provenientes de espaços hospitalares, estão cada vez mais a generalizar-se na comunidade. A utilização regular de antibióticos em hospitais têm tido implicação no desenvolvimento de resistências múltiplas a fármacos [6].

Estudos recentes têm explorado o uso dos efeitos *in vitro* de plantas medicinais, ao identificar e isolar compostos ativos para o desenvolvimento de novas moléculas à base de plantas [7].

1.1. Plantas medicinais

Os princípios ativos provenientes de plantas medicinais são substâncias químicas como os metabolitos secundários, que a planta produz durante o seu crescimento e desenvolvimento (habitualmente quando expostas a condições adversas) e que possuem diversas ações sobre o organismo humano e animal. Muitas plantas possuem uma grande variedade de princípios ativos e cada uma delas apresenta ações específicas sobre determinadas funções fisiológicas [8].

Muitas plantas medicinais com propriedades antimicrobianas ou anti-inflamatórias apresentam ciclos de vida anuais, o que pode dificultar a sua disponibilidade para utilização comercial, desta forma, a aplicação da cultura de tecidos vegetais através da técnica de micropropagação, tornou-se uma importante ferramenta para propagar genótipos de elite (plantas selecionadas como boa fonte de biomoléculas de interesse), em curtos espaços de tempo, com o objetivo de obter altos rendimentos de produção e plantas resistentes a doenças e pragas [9].

1.2. *Cistaceae*

Cistaceae é uma família de arbustos de porte médio, subarbustos e ocasionalmente ervas que são características de habitats secos e ensolarados [10]. A família *Cistaceae* compreende 8 géneros: *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonias*, *Lechea*, *Tuberaria* e cerca de 180 espécies distribuídas nas regiões temperadas e subtropicais do hemisfério norte [11]. Cinco desses géneros (*Cistus*, *Fumara*, *Halimium*, *Helianthemum* e *Tuberaria*) são nativos da zona do mediterrâneo, sudeste da Península Ibérica, Noroeste de África e Portugal [12]. Esta família é representada por arbustos e semi-arbustos, bem como ervas anuais e perenes [13]. Esta família inclui várias plantas medicinais usadas em medicamentos tradicionais para tratar várias condições patológicas, incluindo a hiperglicemia [14]. Alguns limites e relacionamentos taxonómicos dentro da família permanecem inconclusivos ao basearem-se exclusivamente em dados morfológicos [15]. A maioria dos membros desta família são muito aromáticos e perfumados, algumas destas plantas são muito apreciadas na indústria de perfumes e cosmética [16].

1.3. *Tuberaria lignosa*

A *Tuberaria lignosa* (Sweet Samp) (Figura 1) é uma espécie rasteira com flor amarela, proveniente do Oeste e do Sul da Europa. A *Tuberaria lignosa* está muito presente nas regiões ocidentais da Península Ibérica e é uma planta medicinal normalmente encontrada na região do Nordeste Português, onde é tradicionalmente conhecida como Erva-Loba. Na medicina tradicional, as raízes e as folhas são usadas para tratar problemas gastrointestinais, azia, feridas, gripe, e infecções da pele [17], devido às suas propriedades anti-inflamatórias e anti-infecciosas [18]. As folhas da *Tuberaria lignosa* são descritas na literatura como uma fonte de compostos fenólicos, elagitaninos, flavonoides, açúcares e ácido ascórbico. Sabe-se que a *Tuberaria lignosa* contém compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonoides [19]. Esta planta tem associada uma atividade contra a malária e contra o HIV, especificamente na ação inibitória da transcriptase reversa de HIV-1 [20].



Figura 1: *Tuberaria lignosa* no meio natural.

1.4. Cultura de células vegetais

A cultura de células é uma ferramenta que pode ser utilizada no cultivo celular de tecidos e órgãos vegetais, em meio de cultura sólido ou líquido, onde todas as condições físicas e químicas, são definidas em ambiente controlado. Toda a técnica é baseada na totipotência das células vegetais, onde as plantas podem ser regeneradas a partir de partes da planta mãe mantendo a sua genética. A tecnologia de cultura de células vegetais, explora condições que promovem a divisão celular em condições *in vitro* e é considerada uma ferramenta muito importante de investigação e de aplicação industrial [21]. Dentro das principais aplicações

desta técnica, está a conservação de germoplasma, a cultura de embriões, a germinação de sementes e a estabilidade genética ou o aumento de variabilidade.

Começou por ser utilizada no início do século passado, para o estudo e compreensão de alguns mecanismos biológicos das plantas. Com a crescente procura do mercado por novos produtos derivados de plantas, a cultura de tecidos vegetais tornou-se uma técnica bastante importante na produção a nível industrial de plantas [22]. A eficiência com que se pode obter novas plantas, através da micropropagação *in vitro*, torna esta técnica uma ferramenta biotecnológica muito importante para a produção industrial de plantas. Através da micropropagação, é possível produzir plantas de qualidade através da seleção genética, livres de contaminações e resistentes a pragas, além de produção de metabolitos secundários e transformação genética.

Atualmente, muitas empresas da área cosmética e farmacêutica estão dependentes de material vegetal proveniente do meio natural, o que pode levar a um aumento do risco de esgotamento ou até mesmo extinção de algumas espécies. A cultura de tecidos vegetais é um método alternativo de propagação comercial e está a ser amplamente utilizada para a propagação de uma grande variedade de espécies de plantas, incluindo muitas plantas medicinais [23]. Em teoria, a cultura *in vitro* pode ser aplicada a qualquer planta, uma vez que, as células vegetais apresentam no seu genoma todo o material genético necessário para manter as funções vitais da planta no meio de cultura, incluindo metabolismo e totipotência secundária [22]. As aplicações específicas da cultura de tecidos vegetais em plantas medicinais, estão relacionadas principalmente com a produção de metabolitos secundários e com a obtenção de genótipos de compostos de interesse [24].

1.4.1. Micropropagação *in vitro*

Dentro da cultura de tecidos, existe uma técnica de propagação designada por micropropagação. A micropropagação apresenta várias vantagens, como por exemplo, a possibilidade de aumentar rapidamente o número de plantas geneticamente idênticas a partir de plantas selecionadas, a produção de plantas durante todo o ano, mesmo em regiões em que a planta não tem condições para a propagação sexuada e a produção de plantas com elevada qualidade fitossanitária [25].

A biotecnologia vegetal tem tido um papel fundamental na procura de soluções associadas ao crescimento de plantas e ao crescente consumo das mesmas. O crescimento de tecidos celulares vegetais não organizadas em agar, é muito utilizado tanto para estudos bioquímicos como para estudar a diferenciação celular ou mesmo a produção comercial de plantas [26].

O meio Murashige e Skoog, (Tabela 1), é um meio de cultura clássico para células vegetais, quimicamente definido e adequado a um grande número de espécies. Contém na sua composição vitaminas, hidratos de carbono e sais inorgânicos.

Tabela 1- Meio Murashige e Skoog adaptado de ([27])

Substância química	Fórmula
<u>Macronutrientes</u> Nitrato de amónia Nitrato de potássio Cloreto de cálcio Sulfato de magnésio Di-hidrogénio de potássio Ortofosfato	NH_4NO_3 KNO_3 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4
<u>Micronutrientes</u> Sulfato de manganésio Sulfato de zinco Iodeto de potássio Sulfato cúprico Molibdato de sódio Cloreto de cobalto Ácido bórico	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ KI $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ H_3BO_3
<u>Fontes de vitaminas (100X)</u> Ácido nicotínico Cloridrato de tiamina Cloridrato de piridoxina Glicina	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$ $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

1.4.2. Escolha do material vegetal

Escolher fatores como a idade, o tamanho do explante, a época de recolha do material vegetal e a qualidade da planta de origem podem influenciar as fases seguintes do processo de micropropagação. Uma planta mãe mais jovem vai melhorar a resposta *in vitro* dos explantes. Relativamente à época de recolha, plantas recolhidas na Primavera podem ter uma resposta mais positiva *in vitro* do que as plantas colhidas em época de dormência no Inverno. O tamanho do explante tem também um efeito sobre a resposta do tecido vegetal. Geralmente, quanto menor o explante, mais difícil é a cultura e consequente multiplicação. Os explantes com um tamanho maior, contêm mais reservas de nutrientes e reguladores de crescimento, o que resulta num melhor comportamento na cultura *in vitro* [20].

1.4.3. Desinfecção do material vegetal

Os explantes requerem uma desinfecção da superfície antes de poderem ser colocados no meio de cultura. Para este processo geralmente utilizam-se soluções de cloro diluído como o hipoclorito durante tempo variável consoante a sensibilidade do material vegetal a ser tratado e a espécie, seguindo-se várias lavagens com água destilada para remover o desinfetante [28]. Para uma desinfecção eficiente deve manter-se a solução sempre em agitação durante o

processo, para garantir que toda a área de superfície da planta estará em contacto com a solução desinfetante.

1.4.4. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado deve ser adequado a cada uma das fases seguintes. É possível utilizar o mesmo meio de cultura na fase de estabelecimento e na fase de multiplicação. No entanto, os dois passos têm objetivos distintos. Geralmente, o meio de estabelecimento tem como objetivo o despiste de contaminações, manter a planta *in vitro* e obter um ligeiro crescimento do explante. Por vezes, acaba por ser necessário incluir antioxidantes para retardar o escurecimento e a deterioração do tecido vegetal, ou antibióticos para inibir o desenvolvimento de microrganismos. O meio de cultura para a fase de multiplicação é mais complexo sob o ponto de vista de nutrientes, já que o objetivo é a multiplicação da planta e a promoção de novos rebentos. O meio é frequentemente nutrido com compostos que melhoram e otimizam o crescimento e a formação de novos rebentos [29].

1.4.5. Estabelecimento

Este processo pode trazer adversidades relativamente à contaminação e à libertação de compostos fenólicos (como é o caso da *T. lignosa*) que podem trazer problemas no crescimento da planta. Este passo tem como objetivo principal obter explantes viáveis, otimizar o meio de desinfeção e o meio de cultura a utilizar no crescimento mínimo viável do explante [29].

1.4.6. Multiplicação

O objetivo deste processo passa pelo aumento exponencial do material vegetal que possa dar origem a novas plantas. Geralmente a utilização de citocininas no meio de cultura, aumenta a produção de rebentos a partir de gemas laterais. As culturas vegetais provenientes da fase de multiplicação podem ser cultivadas de três a seis ciclos, depois disso existe o risco de alguns explantes não se multiplicarem nas melhores condições. Cada ciclo pode levar a taxas de multiplicação de cinco a dez plantas novas por explante (dependendo da planta) a cada 6-8 semanas [29].

1.5. Extração de compostos bioativos

A utilização de compostos bioativos em diferentes setores comerciais, como o farmacêutico, o alimentar e o químico, reflete uma necessidade de um método padrão adequado para extrair determinados tipos de compostos em plantas [30]. A extração acaba por ser o primeiro passo de qualquer tipo de estudo de plantas medicinais e desempenha um papel muito importante no resultado final de diversos ensaios de quantificação de compostos.

Diferentes técnicas de extração podem ser utilizadas em diversas condições para estudar a seletividade da extração de várias fontes naturais como demonstra a Tabela 2. Todas as técnicas têm objetivos comuns: extrair compostos bioativos de matrizes, aumentar a seletividade para métodos analíticos, aumentar a sensibilidade do ensaio (de forma a aumentar a concentração do compostos de interesse) e ser um método reprodutível que seja independente das variações da amostra [31]. Os compostos bioativos de materiais vegetais podem ser extraídos por várias técnicas de extração como a hidrodestilação, infusão, decocção, ou por solventes orgânicos. Estas técnicas baseiam-se no poder de extração de diferentes solventes e tempos de exposição, com ou sem aplicação de calor [30].

Tabela 2 - Exemplo de alguns compostos bioativos extraídos por diferentes solventes (adaptado de [30]).

Água	Etanol	Metanol
Antocianinas	Taninos	Antocianinas
Taninos	Polifenóis	Terpenoides
Saponinas	Flavonoides	Saponinas
Terpenoides	Terpenoides	Taninos
-	Alcaloides	Flavonoides
-	-	Polifenóis

1.5.1. Hidrodestilação

A hidrodestilação é um método tradicional de extração de compostos bioativos e óleos essenciais de plantas. É uma extração aquosa, onde não está envolvida nenhuma percentagem de solventes orgânicos. Na hidrodestilação, o material vegetal é adicionado a um balão e colocado numa manta de aquecimento, onde é adicionada água. Posteriormente, a água é levada à temperatura de ebulição. A água quente e o vapor são os principais fatores que influenciam a libertação de compostos bioativos da amostra. O arrefecimento no condensador através de água fria, condensa a mistura de vapor de água e óleo. A mistura condensada flui do condensador para um separador, onde o óleo e os compostos bioativos se separam fisicamente da água [32]. A hidrodestilação envolve três processos físico-químicos principais: a hidrodifusão, a hidrólise e a decomposição pelo calor. Em altas temperaturas de extração, alguns componentes voláteis podem ser dissipados. Essa desvantagem pode limitar a utilização desta técnica para a extração de compostos termolábeis, nomeadamente na extração de óleos essenciais [30].

1.5.2. Infusão e decocção

A decocção e a infusão são dois métodos de extração aquosa, com diferentes tempos de atuação da água quente com a planta. O termo infusão refere-se ao aquecimento de água e posterior contacto com a planta. O processo mais conhecido da infusão é a realização de chá, onde a água é submetida a um aquecimento (normalmente durante 5 minutos) e posteriormente

a planta é colocada em contacto com essa água quente [33]. Na decocção, a água é levada à temperatura de ebulição durante 30 minutos juntamente com a planta. O processo de decocção pode degradar alguns compostos mais voláteis devido à duração da exposição ao calor aplicado na água [34].

1.5.3. Extrações por solventes orgânicos

Os solventes utilizados nas extrações, bem como as condições experimentais, afetam o rendimento de extração, o teor total de fenóis e a atividade antioxidante [35]. A extração por solventes orgânicos é frequentemente utilizada para isolar diversos compostos antioxidantes de plantas. Os solventes polares (como soluções aquosas com etanol e metanol) normalmente são utilizados para extrair polifenóis da matriz vegetal. O metanol e o etanol têm sido amplamente utilizados para extrair compostos como taninos, polifenóis ou flavonoides de várias plantas medicinais e de vários alimentos à base de plantas (frutas, vegetais, etc.) [36].

1.6. Capacidade Redutora Total

Muitos métodos disponíveis de quantificação da Capacidade Redutora Total em alimentos ou amostras biológicas são baseados na reação de compostos fenólicos com um reagente colorimétrico que permite a medição no espectro visível [37].

O reagente Folin-Ciocalteu é uma mistura do ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico. Estes ácidos são reduzidos por agentes redutores como os compostos fenólicos. A redução dos compostos ácidos mostra uma cor azul num feixe de absorvência a 760 nm [38]. A concentração dos fenóis é proporcional à intensidade de absorção [39]. Embora a natureza química exata da reação Folin-Ciocalteu seja desconhecida, acredita-se que a sequência de reações de redução reversíveis de um ou dois eletrões levem a espécies azuis [40].

Este método tem inúmeras vantagens, tais como: equipamentos pouco dispendiosos e comuns em laboratório, teste de simples execução e um baixo custo.

1.7. Propriedades antioxidantes em plantas

As plantas produzem uma extraordinária diversidade de metabolitos antioxidantes, que contêm um ou mais grupos hidroxilo ligados a um anel aromático. Flavonoides, antocianinas e taninos são as principais classes de compostos fenólicos que coletivamente representam aproximadamente 40% do carbono orgânico na biosfera [41]. Embora os compostos fenólicos estruturais como a lenhina, a suberina e outros polímeros compreendam grande parte dessa reserva de carbono, variedades destes compostos fenólicos não estruturais têm muita importância nas funções das plantas, atuando também como antioxidantes [42].

Muitos antioxidantes naturais são já conhecidos e muitos são encontrados principalmente no reino vegetal. Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes primários, devido ao seu papel fundamental na eliminação de radicais livres, retardando ou inibindo a etapa de iniciação e ao interromper a etapa da oxidação.

Hoje em dia, sabemos que grande parte dos fitoquímicos provenientes de plantas medicinais, como compostos fenólicos e flavonoides, estão relacionados com um impacto positivo na saúde, nomeadamente na prevenção de diversos cancros [43]. O mecanismo de atuação desses compostos no ciclo celular tumoral não é ainda muito conhecido, no entanto, a atuação do stress oxidativo na indução do cancro e o papel dos antioxidantes na prevenção do cancro é conhecida e descrita. Muitos estudos relacionam a alimentação como uma das principais causas de cancro. A ingestão média de polifenóis por pessoa é de aproximadamente 1g por dia. As principais fontes de antioxidantes na dieta são as bebidas como chás ou vinho tinto, frutas, e em menor concentração, vegetais e legumes [42].

Os radicais livres, particularmente as espécies reativas de oxigénio, são formados naturalmente no organismo quando um átomo ou uma molécula ganha ou perde um eletrão. Os radicais livres desempenham um papel importante em muitos processos celulares. No entanto, em altas concentrações podem ter um efeito negativo nos principais constituintes celulares, incluindo proteínas, DNA e membranas celulares. Esses danos nas células, especialmente danos ao nível do DNA, desempenham um papel crucial no desenvolvimento de cancro [2]. Os efeitos adversos do stress oxidativo na saúde humana são um problema grave e um desequilíbrio na sua concentração, conduz efetivamente a danos de nível biológico [44].

Os antioxidantes são muito bem vistos como aditivos alimentares, principalmente devido às suas capacidades únicas de prolongar o prazo de validade e a qualidade de alguns produtos alimentares, muitos deles sem qualquer efeito adverso nas suas propriedades organoléticas ou nutricionais [42]. A utilização cada vez maior de extratos de plantas na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica sugere que para encontrar compostos ativos é necessário um estudo sistemático de plantas medicinais e dos seus efeitos ativos [45].

1.7.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

O ensaio do DPPH é utilizado para a avaliação do potencial de sequestração de radicais livres de uma molécula antioxidante e é considerado um dos métodos colorimétricos padrão para a avaliação de propriedades antioxidantes de vários compostos. O DPPH é um radical estável em solução, apresenta uma cor púrpura e absorve a 515 nm em metanol. Este ensaio é baseado no princípio de que o DPPH aceita um átomo de hidrogénio da molécula antioxidante, resultando na redução de DPPH para DPPH-H (Figura 2). A cor púrpura muda para amarelo com um constante decréscimo da absorvência a 515 nm. A mudança de cor é monitorizada por

espectrofotometria e utilizada para a determinação dos parâmetros das propriedades antioxidantes [46]. Algumas das vantagens do método DPPH devem-se ao facto de ser mais rápido que outros métodos e pode ser útil na investigação de vários antioxidantes para uma rápida estimativa, tem boa sensibilidade, requer pequenas quantidades de amostra e permite testar amostras lipofílicas e hidrofílicas [47].

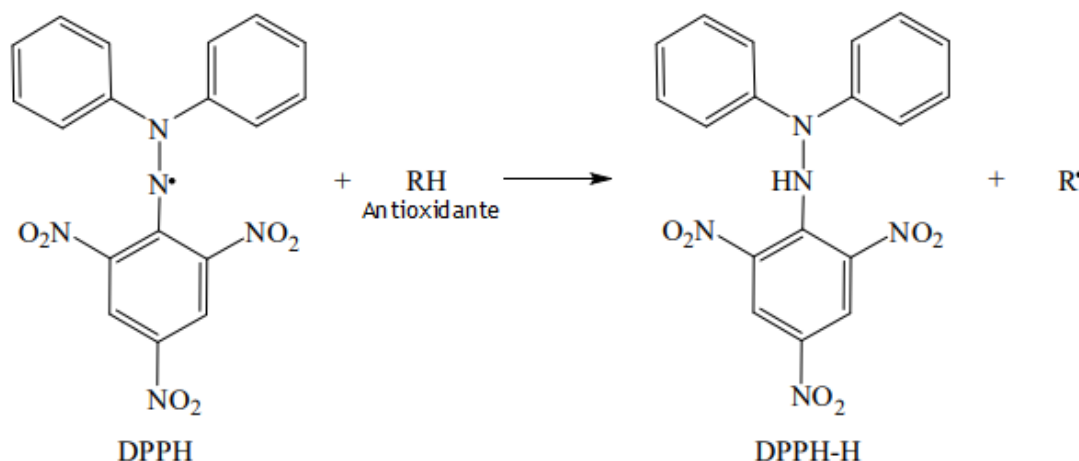


Figura 2 - Conversão do radical livre DPPH em DPPH-H na presença de uma molécula antioxidante (adaptado de [46]).

1.7.2. Poder redutor

A maior parte da atividade antioxidante não enzimática (eliminação de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica, etc.) é mediada por reações de oxidação-redução [48]. A diversidade química de antioxidantes em matrizes complexas, como extratos de plantas, torna difícil a separação e a quantificação de antioxidantes na solução. É recomendável estabelecer métodos que possam medir níveis de capacidade redutora total diretamente dos extratos vegetais.

O teste de poder redutor avalia a capacidade de o antioxidante reduzir o íão ferrocianeto a ferrocianato, que na presença do íão férrico (proveniente do FeCl_3) forma o azul de Prússia. Quanto maior o valor de absorvência, maior a capacidade antioxidante [49].

1.8. Propriedades antimicrobianas em plantas

Existem vários métodos para testar a suscetibilidade de bactérias e leveduras a extratos de plantas. Amostras testadas em métodos de diluição geram resultados em MIC, amostras testadas em testes de difusão em disco geram um diâmetro de inibição medido em milímetros. Os métodos de teste de suscetibilidade encontram-se padronizados e são também considerados métodos de referência, descritos por organizações normativas como o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

Testar a suscetibilidade antimicrobiana é fundamental para a descoberta de novos compostos e assim poder prever um resultado terapêutico. A crescente resistência de microrganismos a substâncias químicas e medicamentos convencionais, acaba por ser um problema mundial grave que leva cada vez mais à investigação e identificação de novos compostos com atividades antimicrobianas [50]. Por esta razão, a descoberta de novos antibióticos é um objetivo importante e cada vez mais emergente. Muitos polifenóis naturalmente presentes em plantas, demonstram ter propriedades antimicrobianas muito interessantes e podem ser considerados uma boa fonte de agentes antimicrobianos [51]. Alguns métodos laboratoriais podem ser usados para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de um extrato ou de um composto puro [52].

1.8.1. Método da difusão em disco

O método da difusão em disco foi desenvolvido em 1940. É um método amplamente utilizado em muitos laboratórios clínicos de microbiologia para fazer testes de suscetibilidade antimicrobiana. Hoje em dia, os padrões aprovados e aceites estão publicados pelo CLSI para testar fungos e bactérias [52]. Neste teste amplamente conhecido, as placas de agar com o meio de cultura adequado, são inoculadas com o microrganismo. Posteriormente, um disco de papel de 6 milímetros é colocado no meio de cultura com cada um dos diferentes extratos [52]. Cada um dos extratos vai difundir através do agar. À medida que o diâmetro do halo de inibição vai aumentando, a concentração do composto ativo decresce [53].

1.8.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

O valor da Concentração Mínima Inibitória (MIC) é definido como a concentração mínima de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível dos microrganismos testados e é expresso em mg/mL ou mg/L. Existem muitas diretrizes e normas aprovadas para este tipo de teste. Os padrões mais reconhecidos são fornecidos pelo CLSI e pelo Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) [52].

Os métodos colorimétricos de teste de suscetibilidade são mais rápidos do que os métodos de cultura padrão e também economicamente mais viáveis comparando com outros métodos. O ensaio da microdiluição com a resazurina é um exemplo disso, uma vez que, se baseia numa reação de oxidação-redução que induz uma mudança de cor de azul para rosa na presença de microrganismos [54].

1.9. Objetivos

O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da multiplicação *in vitro*, caracterização fitoquímica e bioatividade de extratos de *Tuberaria lignosa*. Para tal, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Implementação do processo de micropropagação: iniciação da fase de multiplicação *in vitro*;
2. Efetuar diversas extrações das folhas frescas da *Tuberaria lignosa*;
3. Caracterização fitoquímica dos extratos recorrendo a métodos como DPPH, teor total de fenóis e Poder Redutor;
4. Caracterização do perfil antimicrobiano dos extratos recorrendo a métodos como difusão em disco e determinação da concentração mínima inibitória;

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1. Colheita do material vegetal

O material vegetal foi colhido no dia 23 de Maio de 2017 em Cicouro, na região de Miranda do Douro (41° 30'08.4"N 6° 18'01.9"W).

Foram recolhidas amostras de plantas enraizadas, as quais foram estabelecidas em vasos com terra proveniente do local da colheita. Do material recolhido, foram também trazidas cerca de 500g de folhas e 50g de flores.

As plantas estabelecidas em vasos foram tratadas com fungicida e colocadas em estufa no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI), no sentido de realizar a posterior desinfeção, estabelecimento e multiplicação *in vitro*. As folhas e as flores foram mantidas congeladas a -20C° até posterior utilização.

2.2. Estabelecimento e multiplicação *in vitro*

2.2.1. Desinfeção do material

As amostras foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio e fungicida. O material vegetal foi obtido a partir de plantas cultivadas no CBPBI provenientes da recolha efetuada em Miranda do Douro. Os explantes foram sujeitos a uma lavagem com água corrente, com o objetivo de retirar qualquer sujidade superficial. Após a seleção de estruturas saudáveis, as mesmas foram fragmentadas e submetidas aos testes de desinfeção durante 5 minutos em fungicida Amistar® a 1% e posteriormente em hipoclorito de sódio (2% (m/v) cloro ativo) durante 10 minutos. No final de cada uma destas etapas de desinfeção, os explantes foram lavados com água destilada para retirar os compostos de desinfeção.

2.2.2. Estabelecimento

Os explantes obtidos foram inoculados em meio de cultura, na câmara de fluxo laminar em condições assépticas. Utilizou-se meio Murashige e Skoog (MS), com o pH ajustado em 5,8 e com 7g/L de agar + 1mg⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina). Aproximadamente 15mL de meio foi colocado em cada um dos 200 tubos de ensaio. Foram à autoclave durante 20 minutos, à temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg/cm².

2.2.3. Multiplicação

Os explantes esterilizados obtidos da fase de estabelecimento, foram inoculados em frascos com 50mL de meio de cultura MS modificado com e sem fatores de crescimento como

o BAP (6-benzilaminopurina), Meta-topolin e IAA (ácido indolacético) em diferentes concentrações (Tabela 3). Os meios foram solidificados com 7g/L de agar e o pH foi ajustado a 5,8 antes de autoclavar os frascos a 121°C durante 20 minutos. Os frascos com o material vegetal foram mantidos sob condições controladas de luminosidade e temperatura.

Tabela 3 - Ensaio de multiplicação da *Tuberaria lignosa*.

Tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Meio MS	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
BAP (mgL ⁻¹)	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50	0,50	-	-	-
Meta-topolin (mgL ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	0,50	0,50	0,50
IAA (mgL ⁻¹)	-	-	-	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Luz	Fluorescente	LED	Escuro	Fluorescente	LED	Escuro	Fluorescente	LED	Escuro

2.3. Extrações aquosas

2.3.1. Hidrodestilação Clevenger

Inicialmente, 100g de folhas frescas foram colocadas num balão com 1L com água destilada. A água foi levada à temperatura de ebulição numa manta de aquecimento, ao longo de 4 horas. Posteriormente, a fração aquosa foi filtrada com recurso a uma bomba de vácuo (Vacuum Pump MZ 2CNT) para separar as folhas da água e a amostra foi conservada a -20°C, para posterior liofilização (ZIRBUS technology). No caso das flores, 47,95g foram adicionadas a um balão com 500mL de água, sendo que foram aplicadas as mesmas condições de tempo, temperatura, filtração e conservação anteriormente descritas para os extratos das folhas.

2.3.2. Infusão

Na infusão, 200mL de água destilada foram aquecidos numa placa de aquecimento e, em seguida, foram colocadas 5g de folhas em contacto com a água durante 5 minutos. Após os 5 minutos, a mistura foi arrefecida naturalmente até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, a fração aquosa foi filtrada e congelada a -20°C para posterior liofilização (ZIRBUS technology).

2.3.3. Decocção

Na decocção, uma amostra de 10g de folhas foi aquecida em 200mL de água durante 30 minutos numa manta de aquecimento. Após os 30 minutos, a mistura foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, a fração aquosa foi filtrada sob vácuo (Vacuum Pump MZ 2CNT) e foi congelada a -20°C . Os extratos foram posteriormente liofilizados (ZIRBUS technology).

2.3. Extração por solventes orgânicos

2.3.1 Extração Etanol 96%

Na extração etanólica (96%, v/v), 10g de folhas foram adicionadas num frasco de rosca com 200mL de etanol 96%, o qual ficou a agitar durante a noite (24h) num agitador orbital (Advanced Digital Shaker). No dia seguinte, a amostra foi filtrada sob vácuo e a solução foi transferida para balões onde foi colocado o solvente no evaporador rotativo (IKA, VWR) a uma temperatura de $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$, a 80 rpm, durante aproximadamente 2 horas. Após este processo, o extrato foi seco numa estufa a 40°C , até atingir peso constante. De seguida, foram feitos os cálculos de forma a obter uma concentração de extrato de 50 mg/mL, foi utilizado a solução de etanol 96% para ressuspender a massa do extrato. Parte do extrato foi também ressuscitado numa concentração de 200 mg/mL de DMSO para posteriores análises microbiológicas. As extrações foram feitas em triplicado.

2.3.2 Extração com etanol 50%

Para este procedimento experimental foi preparada uma solução de etanol a 50%, partindo de uma solução de etanol a 96%. Foram adicionadas 10g de folhas num frasco de rosca com 200mL de Etanol 50% e a preparação permaneceu no agitador orbital durante 24 horas (Advanced Digital Shaker). Após este passo a amostra foi filtrada sob vácuo, o extrato foi transferido para um balão de evaporação e o solvente foi colocado no evaporador rotativo (IKA, VWR) a uma temperatura de $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$, a 80 rpm durante aproximadamente 3 horas. Após evaporar todo o solvente, a fração aquosa foi congelada a -20°C e, posteriormente, liofilizada. Parte do extrato liofilizado foi ressuscitado a uma concentração de 200mg/mL em DMSO para

os testes microbiológicos e a outra parte ressuspensa em etanol a 50% com uma concentração de 50 mg/mL para as análises DPPH, Poder Redutor e Capacidade Redutora Total. De seguida, foram feitos os cálculos de forma a obter uma concentração de extrato de 50 mg/mL, foi utilizado a solução de etanol 50% para ressuspender a massa do extrato. Parte do extrato foi também ressuspensa numa concentração de 200 mg/mL de DMSO para posteriores análises microbiológicas. As extrações foram feitas em triplicado.

2.3.3 Extração com metanol 100%

Para a extração metanólica, foram adicionadas 10g de folhas trituradas num frasco com rolha com 200mL de metanol e ficou durante 24h no agitador orbital (Advanced Digital Shaker). Posteriormente, a amostra foi filtrada sob vácuo e o solvente foi colocado no evaporador rotativo (IKA, VWR) a uma temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$, a 80 rpm durante 2 horas. Após evaporar o solvente, os extratos foram colocados numa estufa a 40°C até atingir um peso constante. Foram preparadas soluções com concentrações de 50 mg/mL e 200 mg/mL, as quais foram ressuspensas em metanol e em DMSO, respetivamente, para posteriores análises. As extrações foram feitas em triplicado. De seguida, foram feitos os cálculos de forma a obter uma concentração de extrato de 50 mg/mL, foi utilizado a solução de metanol 100% para ressuspender a massa do extrato. Parte do extrato foi também ressuspensa numa concentração de 200 mg/mL de DMSO para posteriores análises microbiológicas. As extrações foram feitas em triplicado.

2.5. Capacidade redutora total

O teor total de fenóis foi estimado por um método calorimétrico baseado num procedimento descrito por Singleton e Rossi [55] com algumas alterações. Resumidamente, 1mL de cada extrato foi misturado com 1mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, 1 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio foi adicionado à mistura e ajustado para 10 mL com água destilada. A reação foi colocada no escuro durante 90 minutos e a absorvência foi lida a 725nm (SPECORD 200 PLUS). Foi utilizada água destilada como branco. O teor total de fenóis de cada extrato foi determinado recorrendo a uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão (concentrações de 0,01 a 1.0mM). Bons coeficientes de correlação foram obtidos para os diferentes extratos($r > 0.99$). Os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ($\text{mmol}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

2.6. Atividade antioxidante

2.6.1 DPPH

A capacidade de sequestrar radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foi realizada de acordo com o descrito por [56] e por [35]. Alíquotas de cada extrato (0,3 mL) foram adicionadas a 2,7 mL de uma solução de metanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi agitada vigorosamente e colocada no escuro em repouso. Após 1h, a absorvência foi medida a 517 nm (SPECORD 200 PLUS). O controle positivo realizado foi com ácido gálico nas mesmas condições. O efeito sequestrador de radicais DPPH foi calculado como porcentagem da descoloração do DPPH usando a equação:

% de efeito sequestrador = $[(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$, onde A_S é a absorvência da solução na qual o extrato da amostra foi adicionado numa determinada concentração e A_{DPPH} é a absorvência da solução DPPH. As concentrações do extrato que deram origem a 50% de inibição (EC_{50}) foram calculadas a partir dos gráficos de regressão linear.

2.6.2 Poder redutor

O poder redutor dos extratos foi determinado com base no procedimento descrito por [57]. Várias concentrações dos extratos (1mL) foram adicionadas a 2,5 mL de tampão fosfato 0,2M (pH6,6) e 2,5 mL de solução 1% (p/v) de ferrocianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$). As misturas foram incubadas a 50 °C em banho maria durante 20 minutos. Posteriormente, a mistura foi deixada à temperatura ambiente até arrefecer e foram adicionados 2,5mL de solução TCA a 10% (p/v). A solução foi misturada, e retirada uma alíquota de 2,5mL para outro tubo ao qual foram adicionados 2,5 mL de água e, posteriormente, adicionados 0,5 mL de solução de cloreto de ferro ($FeCl_3$) a 0,1%. Após repouso de 2 minutos, foi lida a absorvência a 700nm. A concentração de extrato com a absorvência de 0.5 (EC_{50}) foi calculada através do gráfico de regressão linear, obtido pela razão entre a absorvência e a concentração de cada extrato.

2.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

2.7.1. Estirpes de microrganismos e meios de cultura

Foram utilizadas onze estirpes de microrganismos para fazer os estudos antimicrobianos (Tabela 4). Relativamente às bactérias, as gram-negativas utilizadas foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* LMG 1025. As Gram-positivas utilizadas foram: *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Bacillus cereus* ATCC 11778. Foram ainda utilizadas duas estirpes de fungos: *Candida albicans* ATCC 24433 e *Candida tropicalis* ATCC 750.

As culturas de stock foram preparadas e armazenadas com glicerol a 20% a -80°C . Todas as estirpes foram subcultivadas 24h antes dos ensaios. As estirpes bacterianas foram cultivadas em Brain Heart Infusion (BHI) e as leveduras em Sabouraud Dextrose Agar (SDA), para crescimento.

Tabela 4- Estirpes de microrganismos utilizadas nos ensaios antimicrobianos.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Gram-negativas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	
<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1025	
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	Gram-positivas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	Leveduras
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	

2.7.2. Teste de difusão em disco

A atividade antimicrobiana de todos os extratos da *Tuberaria lignosa* foi avaliada pelo ensaio de difusão em disco, seguindo a norma M2-A8 para bactérias e a norma M44-A2 para leveduras descritas pelo CLSI. Os inóculos foram preparados por suspensão direta de algumas colônias dos microrganismos em solução salina (NaCl 0,85%) estéril, sendo a turbidez das suspensões ajustada a 0,5 unidades de McFarland. Foram adicionados 20 μL de cada um dos extratos (200 mg/mL em DMSO) a discos de celulose com um diâmetro de 6 mm. Para os controlos negativos foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO). Como controlos positivos utilizou-se a tetraciclina (30 μg /disco) e a anfotericina B (25 μg /disco) para as bactérias e leveduras, respetivamente. Em seguida, as placas de Mueller-Hinton agar (MHA) foram utilizadas para inocular bactérias. Para as inocular as leveduras utilizou-se o meio MHA suplementado com 100 μL de uma solução aquosa de azul de metileno (5 mg/mL) por litro de meio e com 20 g de glucose por litro de meio. De seguida, os discos previamente preparados com os extratos foram colocados sobre o agar. As placas que foram inoculadas com bactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas e as placas que foram inoculadas com as leveduras foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Após a incubação, todas as placas foram verificadas visualmente quanto a zonas de inibição e os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com um paquímetro. Este teste foi realizado por três vezes independentes.

2.7.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Na determinação do MIC utilizaram-se apenas os dois extratos polares com mais potencialidade no teste da difusão em disco. A hidrodestilação das folhas e o etanol 50%. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) dos dois extratos foram determinadas pelo método da resazurina descrito por [58]. As placas foram preparadas sob condições assépticas. 100 µL dos extratos em 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração de 20 mg/mL em MHB foram pipetados na primeira fila da placa. Em seguida, 50 µL de MHB foram adicionados a cada um dos poços restantes. Diluições em série foram realizadas usando uma pipeta multicanal. As pontas foram descartadas após o uso para que cada poço tivesse 50 µL do material de teste em concentrações descendentes. De seguida foram adicionados 10 µL de solução de resazurina (0,1% em MHB) a cada poço. Com recurso a uma micropipeta, 30 µL de meio MHB foram então adicionados a cada poço. Finalmente, 10µL de suspensão bacteriana (0,5 McFarland) foram adicionados a cada poço. A placa foi colocada em estufa a 37°C durante 18h.

No caso das leveduras o inóculo foi preparado ao transferir as colónias para a solução salina a fim de obter uma turbidez de 0,5 McFarland. Foi utilizada a resazurina como indicador de crescimento celular. A suspensão (inóculo com uma diluição de 1:1000 no meio de cultura) foi suplementado com uma solução estéril de resazurina (20 mg/mL). O meio de cultura usado para este teste foi preparado ao dissolver 5,215g de meio RPMI-1640, suplementado com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato e 3-(Nmorfolino) ácido propanossulfónico (MOPS, 35,53g) em água destilada (400mL). O pH foi ajustado entre 6.9 e 7.1 a 25°C com hidróxido de sódio 1M. Após a diluição para um volume de 0.5L, o meio foi esterilizado por filtração e armazenado a 4°C até ser utilizado. A microdiluição foi realizada como descrito nas bactérias, mas para um volume final de 200µL. As placas foram preparadas em triplicado e colocadas a incubar a 37°C por 24 horas. A mudança de cor foi avaliada visualmente. Qualquer mudança de cor de roxo para rosa ou incolor foi registada como positiva. A menor concentração na qual ocorreu a mudança de cor foi considerada como a concentração inibitória mínima (MIC). Para os controlos positivos foram utilizadas a tetraciclina para as bactérias e a anfotericina B para as leveduras.

2.8. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e usou-se para os testes o valor da média dos resultados. Os dados do estudo da Micropropagação *in vitro* foram obtidos através da comparação dos diferentes tratamentos no primeiro ciclo e no segundo ciclo (para os rebentos formados, para o comprimento do explante e para a percentagem de morte necrótica) através do teste t-student pareado após ser testada a normalidade das amostras. Os dados dos estudos fitoquímicos e dos testes antimicrobianos foram sujeitos à análise da variância (ANOVA) de forma a perceber as diferenças existentes entre os diferentes tratamentos e em comparação

aos controlos. As diferenças estatísticas obtidas entre as diferentes médias foram obtidas usando o teste de Duncan ($p=0,05$). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste t-student, $p<0,05$.

Capítulo 3-Resultados e Discussão

3.1. Micropropagação *in vitro*

3.1.1. Multiplicação *in vitro* da *Tuberaria lignosa*

No ensaio de multiplicação *in vitro*, foram multiplicados 15 explantes em cada um dos diferentes nove tratamentos e foi calculada a média, como demonstra a tabela 5. Foram avaliados parâmetros como o tipo de luz, fator de multiplicação, comprimento do explante e taxa de mortalidade durante dois ciclos de 45 dias cada um.

Como demonstra a Figura 3, o tratamento 2 (Luz LED, BAP-1 mgL⁻¹) e o tratamento 8 (Luz LED, meta-Topolin 0.5 mgL⁻¹, IAA-0.05 mgL⁻¹) foram os que tiveram uma média mais alta relativamente a novos rebentos, o que faz todo o sentido, uma vez que o meta-Topolin é uma citocinina descrita como grande influenciadora na diferenciação de novos rebentos. Este resultado também nos indica que um dos fatores mais positivos é a luz incidida, neste caso a luz LED. Por outro lado, e para confirmar ainda mais este resultado, o tratamento 3, 6 e 9 (todos eles no escuro) foram os que tiveram menor média no número de novos rebentos.

Em média, o número de novos rebentos no 1º ciclo é de 1,63 e no 2º ciclo é de 1,65 cm como demonstra a figura 4.

Tabela 5 - Média dos rebentos formados no primeiro e segundo ciclo para os diferentes tratamentos

Tratamentos	1º ciclo	2º ciclo	P value
T1	1,73	1,93	0,891
T2	2,20	2,20	
T3	1,20	1,20	
T4	1,67	1,67	
T5	1,60	1,60	
T6	1,53	1,53	
T7	1,67	1,67	
T8	1,93	1,93	
T9	1,13	1,13	

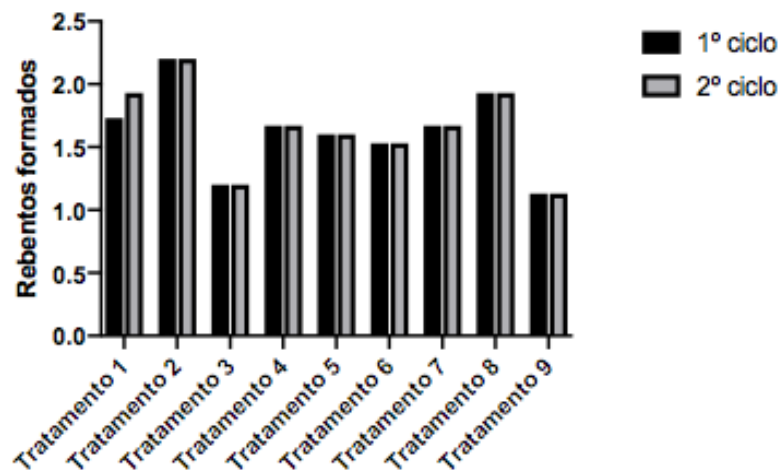


Figura 3- Relação entre novos rebentos formados e o tipo de tratamento no primeiro ciclo (45 dias) e no segundo ciclo (45 dias).

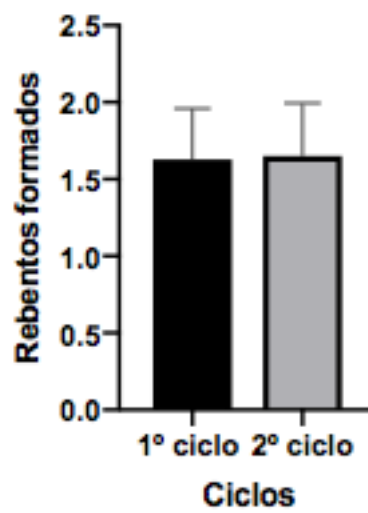


Figura 4 - Análise dos rebentos formados no primeiro e segundo ciclo.



Figura 5-Explantos de *Tuberaria lignosa* *in vitro* após 45 dias de cultivo no tratamento 5.

Relativamente à influência dos tratamentos testados no crescimento dos explantes, como demonstra a Figura 5 e a tabela 6, é novamente notória a influência positiva da luz LED no tratamento 2 e no tratamento 5, os que têm a média mais alta de crescimento dos explantes. Logo a seguir vem o tratamento 1, o que nos pode indicar que a citocinina BAP também é um importante fator no que diz respeito ao crescimento dos explantes.

Nos tratamentos 7,8 e 9 o crescimento não é muito acentuado, o que nos pode indicar que o meta-Topolin teve maior influência no número de novos rebentos do que no crescimento dos explantes. No trabalho descrito por [59] na *Tuberaria major*, onde foram testados diferentes tipos de hormonas como a zeatina, a cinetina e a 6-benzilaminopurina (BAP) e a média de explantes mais elevada foi de 1,8cm, pelo que a combinação das hormonas utilizadas neste trabalho teve um maior efeito no crescimento dos explantes após 90 dias, ainda que numa espécie diferente.

Em média, o comprimento dos explantes após o primeiro ciclo, demonstrados na figura 6 e 7, é de 1,51 cm e após o segundo ciclo é de 1,94 cm. Na figura 8 é possível perceber o crescimento das plantas após 45 dias.

Tabela 6 - Média do crescimento do explante (em cm) no primeiro e segundo ciclo para os diferentes tratamentos

Tratamentos	1º ciclo	2º ciclo	P value
T1	1,52	2,03	0,004
T2	1,60	2,32	
T3	1,37	1,72	
T4	1,58	2,14	
T5	1,77	2,58	
T6	1,48	1,79	
T7	1,41	1,83	
T8	1,51	1,74	
T9	1,31	1,35	

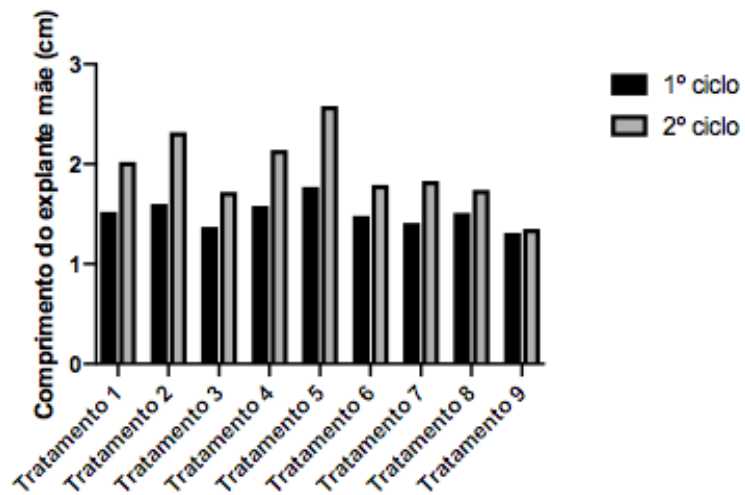


Figura 6-Relação entre o crescimento dos explantes (cm) com os diferentes tratamentos.

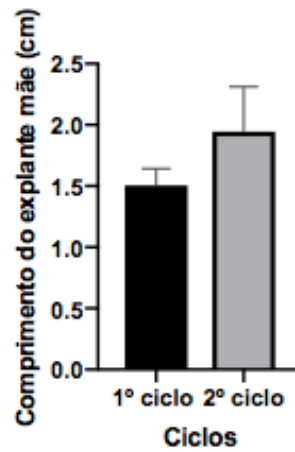


Figura 7 - Análise do crescimento dos explantes (cm) no primeiro e segundo ciclo.



Figura 8-Crescimento das plantas após 45 dias de cultivo no tratamento 5.

Na morte necrótica, a figura 9 que os tratamentos 3, 6 e 9 (tratamentos no escuro) têm sempre a taxa mais elevada após o segundo ciclo. Ainda assim, a taxa necrótica encontra-se acima do esperado o que indica que vários fatores químicos e físicos pode ser otimizado com mais parâmetros no futuro. A média da % de mortes necróticas é de 48% no primeiro ciclo e de 59% no segundo ciclo, como demonstra a figura 10.

Tabela 7 - Média da % de plantas necróticas com o tratamento utilizado no primeiro ciclo e no segundo ciclo reprodutivo

Tratamentos	1º ciclo	2º ciclo	P value
T1	60,00	60,00	0,650
T2	56,00	56,00	
T3	60,00	84,00	
T4	48,00	56,00	
T5	8,00	28,00	
T6	68,00	76,00	
T7	52,00	52,00	
T8	32,00	32,00	
T9	44,00	86,00	

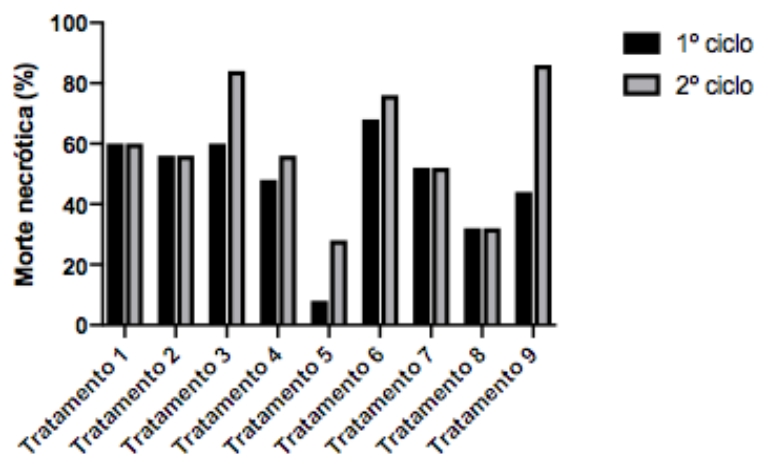


Figura 9-Relação entre a % de plantas necróticas com o tratamento utilizado no primeiro ciclo e no segundo ciclo reprodutivo

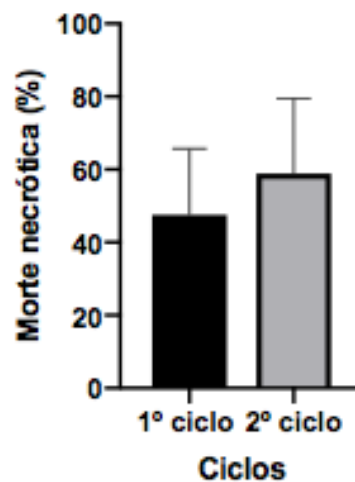


Figura 10 - Análise da % de mortes necróticas com o tratamento utilizado no primeiro e no segundo ciclo.

Muitas plantas ao fim de 45 dias demonstravam ter clorose (falta de clorofila) (figura 11), que mais tarde pode tornar-se em necrose (figura 12), o que demonstra que o meio de cultura pode estar a tornar-se fitotóxico, provavelmente devido ao excesso de nutrientes no meio. De facto, os melhores resultados demonstram a importância da luz LED utilizada neste ensaio. A utilização de lâmpadas LEDs vermelhas e azuis (utilizadas neste trabalho) são uma alternativa para o cultivo de plantas *in vitro*. Sabe-se que a luz vermelha e a luz azul são absorvidas pela clorofila A, que é a responsável pela eficácia fotossintética. Por outro lado, sabe-se que a contribuição da luz azul está na estimulação da síntese proteica que auxilia o processo fotossintético, além de contribuir para o normal desenvolvimento de cloroplastos. A luz vermelha está fortemente relacionada com o processo de inibição da passagem da sacarose para tecidos clorófitos [60].



Figura 11-Exemplos de plantas *in vitro* com clorose após 45 dias no tratamento 9.



Figura 12-Exemplos de plantas *in vitro* com necrose após o segundo ciclo no tratamento 9.

3.2. Estudos fitoquímicos

3.2.1. DPPH

Relativamente ao método DPPH, os resultados foram expressos em EC_{50} que corresponde à concentração de extrato necessária para atingir 50% de inibição dos radicais livres de DPPH (de acordo com a Tabela 8 e Figura 13). Assim, valores de EC_{50} mais baixos representam maior atividade antioxidante. Neste sentido, o extrato mais ativo foi o extrato da hidrodestilação das flores mostrando concentrações médias mais baixas (EC_{50} - 43.6274 $\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$), seguido pelo da hidrodestilação das folhas e os extratos obtidos durante 30 minutos com água e de 5 minutos com água (EC_{50} - 47.2561 $\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$, EC_{50} - 50.7426

$\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$, EC_{50} - 52.3067 $\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$, respetivamente). Por outro lado, os extratos de solventes orgânicos (etanol e metanol) demonstram ter menor atividade, uma vez que, apresentaram concentrações médias mais altas (EC_{50} - 73.8849 $\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$ para o Etanol a 50%, EC_{50} - 127.1159 $\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$ para o metanol, EC_{50} - 156.0722 $\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$ para o Etanol a 96%). No caso do etanol verificou-se que quanto mais alta for a concentração de etanol menor é a atividade antioxidante, mostrando que estes solventes conseguem retirar da planta uma menor quantidade de compostos com atividade antioxidante. Os resultados obtidos por este trabalho estão de acordo com as gamas apresentados por [18].

Tabela 8- Valores de EC_{50} no ensaio DPPH, em μg extrato/mL ($p < 0,05$).

Extrato	$\text{EC}_{50}(\mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL})$	P-value
Padrão Ác. Gálico	33,393 \pm 1,231	0,016
Hidrodestilação Folhas	47,256 \pm 0,723	
Hidrodestilação Flores	43,627 \pm 0,828	
Água 5 min (infusão)	52,306 \pm 3,860	
Água 30 min (decocção)	50,742 \pm 3,781	
Etanol 50%	73,884 \pm 5,567	
Etanol 96%	156,072 \pm 5,021	
Metanol	127,115 \pm 9,496	

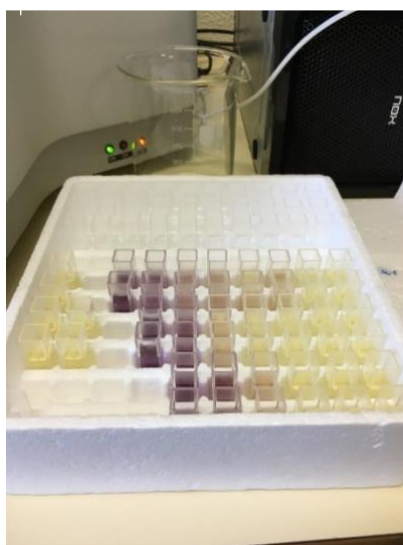


Figura 13-Amostras de extratos no ensaio DPPH antes da leitura no espectrofotómetro.

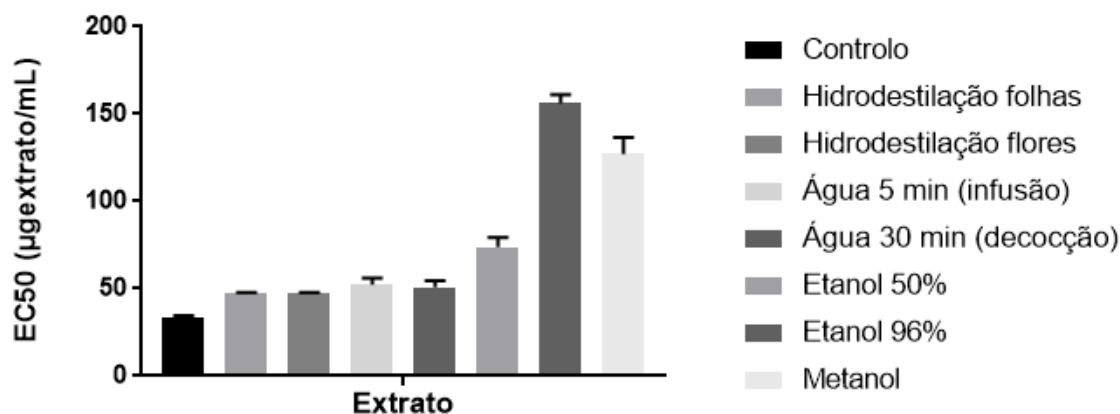


Figura 14-Relação do EC₅₀ no ensaio DPPH com os diferentes extratos.

Comparando estes resultados com o ácido gálico, os valores dos extratos são sempre superiores, ou seja, menos ativos. Contudo, as ordens de grandeza obtidas são semelhantes, demonstrando assim ter uma atividade antioxidante semelhante à do padrão comercial. Isto pode significar que os extratos que foram usados neste trabalho são uma boa fonte de compostos com atividade antioxidante.

Ao comparar este resultado com o descrito em [20], (em que foi obtido um valor de EC₅₀ na ordem dos 52,1±0,44 µg/mL utilizando folhas secas), pode concluir-se que as folhas frescas utilizadas neste trabalho resultaram num valor mais baixo de EC₅₀, o que indica um maior poder de inibição de radicais livres em relação às folhas secas. Comparando também com espécies da mesma família como *Cistus salviifolius* e *Cistus monspeliensis*, estes resultados apresentam-se com um maior valor de EC₅₀, tendo estas duas espécies supramencionadas mostrado maior potencial antioxidante do que a *T. lignosa* nas condições testadas por [14] e com outro padrão.

3.2.2. Poder redutor

O ensaio do Poder Redutor baseia-se na capacidade de redução do Fe(III), que apresenta uma coloração amarela, a Fe(II) que apresenta uma tonalidade entre o verde e o azul. Neste caso, todos os extratos aquosos demonstraram ter maior poder que o ácido gálico (EC₅₀-173,8855 µg_{extrato}/mL). O mais ativo foi a hidrodestilação das flores tendo tido a concentração média mais baixa (EC₅₀-105,5820 µg_{extrato}/mL), seguindo-se a hidrodestilação das folhas (EC₅₀-108,0580µg_{extrato}/mL) e dos extratos de água 30 minutos e 5 minutos respetivamente (EC₅₀-135,0530 µg_{extrato}/ml / EC₅₀-141,7782 µg_{extrato}/ml). Por outro lado o melhor extrato dos solventes orgânicos é o Etanol 50% (EC₅₀-171,0611 µg_{extrato}/ml), seguindo-se do Metanol (308,1976 µg_{extrato}/ml) e por fim o Etanol 96% (EC₅₀-352,792 µg_{extrato}/ml).

De salientar que semelhante ao DPPH, neste método quanto menor a concentração de água utilizada na extração, menor também o efeito de poder redutor como demonstra a tabela 9 e a figura 13.

Tabela 9 - Valores de EC₅₀ descritos em µg/mL no ensaio do Poder Redutor, (p<0,05).

Método de Extração	EC ₅₀ (µg/mL)	P value
Padrão Ác.Gálico	173,88 ± 8,156	0,704
Hidrodestilação Folhas	108,05 ± 4,522	
Hidrodestilação Flores	105,58 ± 4,056	
Água 5 min (infusão)	141,77 ± 3,146	
Água 30 min (decocção)	135,05 ± 10,827	
Etanol 50%	171,06 ± 12,078	
Etanol 96%	352,79 ± 16,908	
Metanol	308,19 ± 41,511	

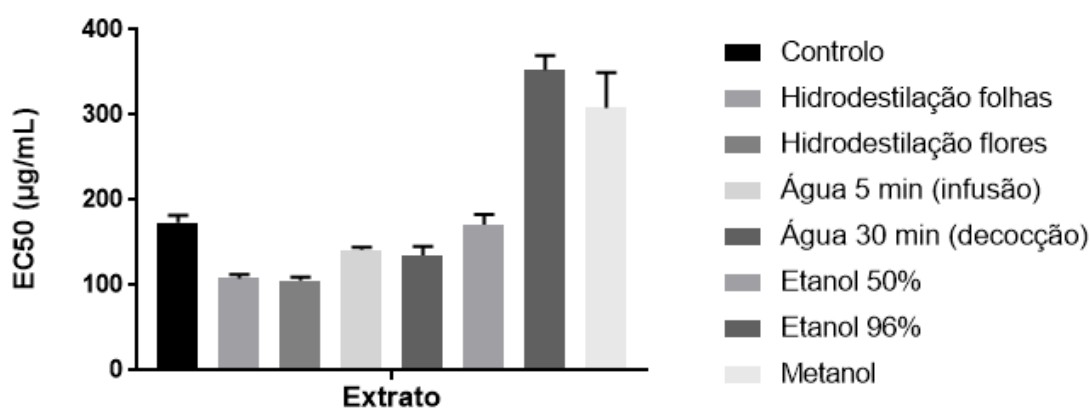


Figura 15 -Relação entre o EC₅₀ e os diferentes extratos no Poder Redutor.

Apesar dos extratos aquosos terem tido um valor inferior ao padrão utilizado neste trabalho, comparando estes resultados com os descritos em [18] (21.3±0.16 µg/mL) para a mesma espécie, conclui-se que, as folhas frescas utilizadas neste trabalho apresentam uma menor capacidade na redução do Ferro(III) a Ferro(II). Relativamente aos testes de poder redutor a espécie da mesma família como a *Cistus salvifolius* e *Cistus monspeliensis* descritos por [14], apesar do padrão ser o ácido ascórbico, os resultados foram de uma ordem de grandeza muito superior (524.13 mg/mL ± 1.18) o que demonstra que, a *Tuberaria lignosa* apresenta

maior capacidade de poder redutor do que estas espécies supramencionadas da família *Cistacea*.

3.2.3. Capacidade Redutora Total

O teor de fenóis totais foi expresso em mmol de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/g de extrato. É importante salientar que, as condições ideais para a extração de compostos fenólicos totais devem extrair a maior quantidade desses compostos e a menor quantidade de substâncias estranhas ou contaminantes com a capacidade de reagir da mesma forma com o reagente de Folin-Ciocalteu.

Pelos resultados apresentados na Tabela 10, pode concluir-se que os extrações que apresentaram maior capacidade de extrair compostos fenólicos foram os extratos aquosos, nomeadamente os 30 minutos com água, seguido da infusão e da hidrodestilação das flores e das folhas (1,9165 mmol GAE/g_{extrato}, 1,8398 mmol GAE/g_{extrato}, 1,6657 mmol EAG/g_{extrato}, 1,7056 mmol EAG/g_{extrato}, respetivamente). Por outro lado, os extratos obtidos com recurso a solventes orgânicos foram os que apresentaram menores teores de compostos fenólicos (Etanol 50% - 1,2645 mmol GAE/g_{extrato}, Etanol 96% - 0,7505 mmol GAE/g_{extrato}, Metanol - 0,7193 mmol EAG/g_{extrato}).

Tabela 10- Valores da Capacidade Redutora Total em mmol/g de equivalentes de Ácido gálico/g de extrato.

Extrato	Conc. (mmol EAG/g extrato)	P value
Hidrodestilação Folhas	1,705 ± 0,169	0,075
Hidrodestilação Flores	1,667 ± 0,154	
5 minutos (infusão)	1,839 ± 0,189	
30 minutos (decoção)	1,916 ± 0,228	
Etanol 50%	1,265 ± 0,141	
Etanol 96%	0,750 ± 0,087	
Metanol	0,719 ± 0,108	

Desta forma, os resultados salientam a importância da escolha do solvente mais adequado para a extração de compostos fenólicos da erva loba (*Tuberaria lignosa*). De facto, estes dados indicam que solventes com maior polaridade, como água, extraem estes compostos com maior eficácia. Em contraste, os solventes como o metanol e etanol 96%, são menos eficientes na extração de fenóis a partir da erva loba (*Tuberaria lignosa*).

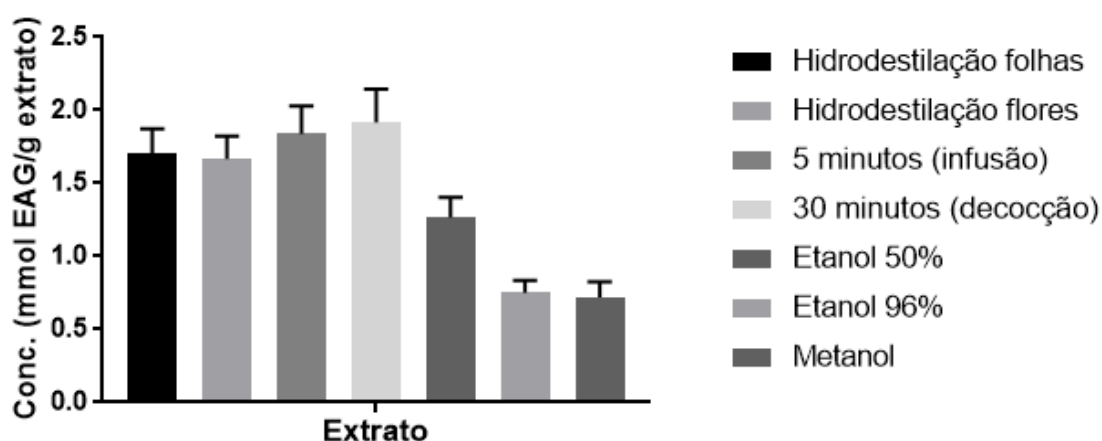


Figura 16-Relação entre a Capacidade Redutora Total nos diferentes extratos expressos em equivalentes de Ácido Gálico.

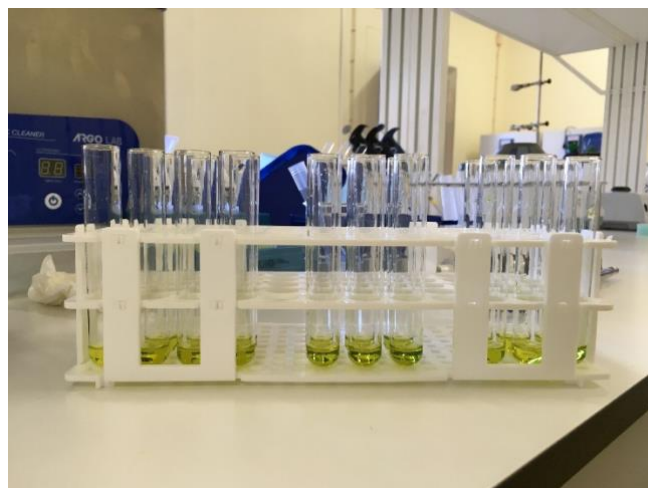


Figura 17-Reagente Folin-Ciocalteu no teste da Capacidade Redutora Total.

3.3. Testes antimicrobianos

3.3.1. Teste da difusão em disco

Com os resultados apresentados na Tabela 11, pode concluir-se que os extratos da *Tuberaria lignosa* contêm compostos que inibem tanto o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*), como o crescimento de bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella Typhimurium*), notando-se o mesmo efeito inibitório apenas na *Candida tropicalis*, no caso das leveduras testadas.

É de notar que os extratos etanólicos com concentração de 50% têm mais atividade em todas as bactérias do que os extratos de 96% (exceto no caso da *Acinetobacter baumannii*), possivelmente devido à maior quantidade de água presente no etanol 50%, logo tem maior polaridade.

Relativamente aos extratos aquosos, tanto a infusão como a decocção têm uma atividade muito semelhante, sendo que a hidrodestilação tanto das flores como das folhas, mostrou ter em média, uma atividade relativamente superior, o que nos indica que quanto maior o tempo de exposição ao calor, maior a concentração de compostos com propriedades antimicrobianas extraídos. Na *Candida tropicalis*, apenas as hidrodestilações demonstraram ter algum efeito inibitório, sendo que a hidrodestilação das flores demonstrou ser mais efetiva. A estirpe *Staphylococcus aureus* demonstrou ser a estirpe mais suscetível aos extratos testados, com a média mais próxima da tetraciclina.

O n-Hexano é um solvente apolar, como tal, não dissolve compostos fenólicos. Os extratos provenientes do n-Hexano não contêm qualquer tipo de atividade nestes microrganismos, sendo que estes extratos foram excluídos dos posteriores ensaios microbiológicos.

Ao comparar este resultado com o descrito por [61] na *Cistus salvifolius*, da mesma família *Cistaceae*, onde foi obtido um diâmetro de inibição de 20 ± 1 mm para a *Listeria monocytogenes*, percebemos que a *Tuberaria lignosa* tem um menor efeito contra a *Listeria monocytogenes* do que a *Cistus salyifolius*, ainda assim mais efeito antimicrobiano do que a tetraciclina para esta estirpe. Extratos com maior concentração de água, conseguiram obter em média melhores atividades antimicrobianas no teste da difusão em disco, por isso, é possível concluir que neste teste, os extratos aquosos ou com alguma concentração de água, têm mais compostos antimicrobianos do que os solventes orgânicos como o metanol e o etanol. Como os meios de cultura possuem uma grande percentagem de água, é possível que os compostos provenientes de extrações mais aquosas, consigam difundir com maior sucesso no meio de cultura do que compostos provenientes de extrações por solventes orgânicos.

Tabela 11 - Diâmetro de inibição em mm da difusão em disco, (** $p < 0.05$, comparativamente ao controlo positivo e ao controlo negativo, * $p < 0.05$ comparativamente ao controlo positivo)

Estirpes/Extratos	Etanol 96%	Etanol 50%	n-Hexano	Metanol	Infusão	Decocção	Hidrodestilação (folhas)	Hidrodestilação (flores)	DMSO	Tetraciclina	Anfotericina B
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	10.12 ±0.40**	12.10±0.40**	6±0.00*	9.74±0.40**	13.69±0.88**	15.57±0.74**	17.68±1.57**	13.68±1.80**	6.00±0.00	30.25±0.50	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	24.17±3.94**	25.06±5.89**	6±0.00*	17.28±3.83**	13.27±2.29**	13.41±1.16**	14.13±1.02**	10.42±0.71**	6.00±0.00	30.00±0.82	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9.00±0.16**	11.64±1.01**	6±0.00*	8.72±2.65**	10.11±1.51**	8.02±0.76**	10.65±0.41**	9.83±0.28**	6.00±0.00	18.25±0.60	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1025	14.17±0.85**	13.20±0.65**	6±0.00*	15.42±0.54**	14.72±0.44**	13.26±0.67**	15.87±0.87**	15.42±1.22**	6.00±0.00	25.20±0.58	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311	10.82±1.95**	13.68±1.80**	6±0.00*	12.13±2.16**	12.42±1.95**	11.34±1.50**	11.27±2.65**	9.40±1.25**	6.00±0.00	23.25±0.50	-
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	13.30±2.86**	14.11±0.23**	6±0.00*	9.50±1.49**	13.12±1.68**	10.91±0.49**	12.88±2.42**	10.44±0.3**	6.00±0.00	11.50±0.58	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13.84±1.29**	15.04±0.46**	6±0.00*	14.94±0.14**	18.01±0.08**	18.78±0.94**	20.55±0.76**	20.35±1.07**	6.00±0.00	22.25±0.50	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	9.82±0.46**	12.63±0.30**	6±0.00*	10.47±0.58**	13.40±0.87**	13.70±0.68**	10.83±0.70**	13.25±1.07**	6.00±0.00	25.63±0.25	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	13.84±0.71**	15.17±0.78**	6±0.00*	14.43±0.13**	16.07±0.64**	16.99±0.42**	16.36±0.72**	17.54±0.42**	6.00±0.00	28.45±0.52	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	6.00±0.00*	6.00±0.00*	6±0.00*	6.00±0.00*	6.00±0.00*	6.00±0.00*	6.00±0.00*	6.00±0.00*	6.00±0.00	-	20.33±0.58
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	6.00±0.00*	6.00±0.00*	6±0.00*	6.00±0.00*	6.00±0.00*	6.00±0.00*	7.21±1.70*	15.55±1.67*	6.00±0.00	-	21.50±0.58

3.3.2. Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os valores de Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos foram determinados pelo ensaio de microdiluição utilizando como indicador de viabilidade celular a resazurina (Figura 18 e Tabela 12). A utilização da resazurina deve-se ao facto de, na determinação dos valores de MIC, a inibição do crescimento ser avaliada pela turbidez, acontece que os extratos precipitam e não se conseguem distinguir o crescimento microbiano dos extratos precipitados, daí a utilização deste reagente calorimétrico que reage com a morte celular.

Nas bactérias, os dois extratos não têm uma atividade significativa. É possível inibir o crescimento da bactéria *Bacillus cereus* ATCC 11778 numa concentração mínima de 1.25 mg/mL através dos dois extratos, ainda assim um valor substancialmente superior à tetraciclina (0.06 µg/mL). Na *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, o valor do MIC foi mais baixo para o extrato aquoso (0,625 mg/mL) comparativamente com o extrato etanólico (1.25 mg/mL) ainda assim longe da tetraciclina (0.06µg/mL).

Relativamente às leveduras, o resultado foi positivo. Tanto o extrato aquoso como o extrato etanólico têm uma concentração mínima inibitória muito mais baixa. Na *Candida albicans* ATCC 90028 (0.08mg/mL e 0.0195 mg/mL respetivamente) e na *Candida tropicalis* ATCC 750 (0.08 mg/mL e 0.0195 mg/mL respetivamente), os valores mostram que os extratos têm muito mais atividade do que em bactérias.

Apesar de alguns extratos não apresentarem zonas de inibição significativas no ensaio de difusão do disco, apresentaram valores baixos de MIC, sendo este um indicador de boas propriedades antimicrobianas, esse facto pode dever-se à má difusão dos extratos nas placas de agar.

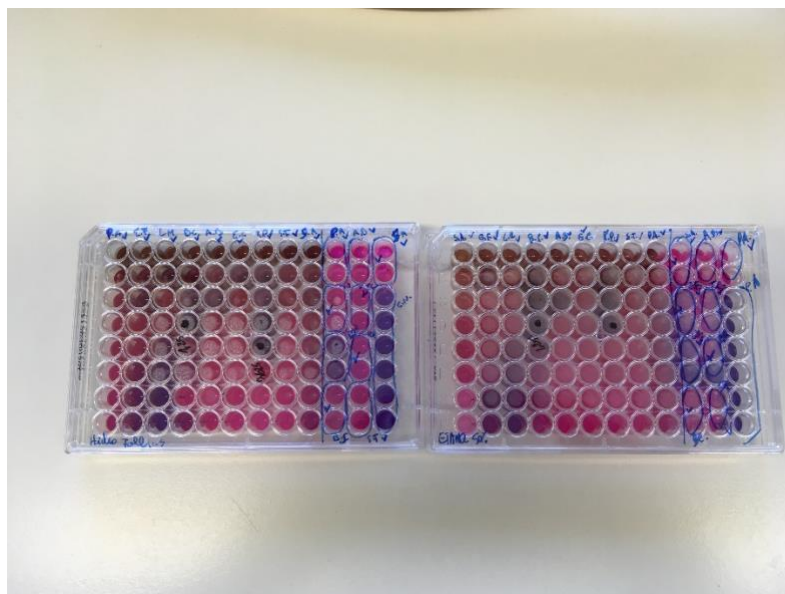


Figura 18- Ensaio de microtitulação de resazurina.

Tabela 12 - Valores de MIC determinados pelo ensaio de microdiluição com a resazurina, (**:p<0.05 comparativamente ao controlo positivo e ao controlo negativo)

Estirpes	Concentração Mínima Inibitória (MIC)				
	DMSO (%)	tetraciclina (µg/mL)	anfotericina B (µg/mL)	Extrato- Hidrodestilação folhas (mg/mL)	Extrato Etanol 50% (mg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 20	0.06	-	>10**	>10**
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	> 20	0.06	-	1.25**	1.25**
<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	> 20	0.06	-	>10**	>10**
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 20	0.06	-	>10**	>10**
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 20	0.06	-	>10**	>10**
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 20	0.24	-	>10**	>10**
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	> 20	0.06	-	0.625**	1.25**
<i>A. baumannii</i> LMG 1025	> 20	0.06	-	>10**	>10**
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	> 20	0.24	-	>10**	>10**
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	> 20	-	0.25	0.0195**	0.08**
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	> 20	-	0.50	0.0195**	0.08**

Segundo a literatura científica, o ensaio da microdiluição usando a rezasurina nunca foi feito para esta espécie vegetal. Ainda assim, foram encontrados resultados de MIC em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* para plantas da mesma família, como a *Helianthemum hirtum* onde se obtivera 0.625 mg/mL, 2.5 mg/mL 1.25 mg/mL e 2.5 mg/mL respectivamente [62]. Neste trabalho, as folhas de *Helianthemum hirtum* também foram testadas em fresco, o que nos leva a concluir que a *Tuberaria lignosa* tem menos efeito antimicrobiano em bactérias do que a *Helianthemum hirtum*, planta da mesma família. A *Tuberaria lignosa* foi colhida do habitat natural e Maio, época sem grandes variações de temperatura. Se a planta tivesse sido colhida em época de inverno com grandes amplitudes térmicas, possivelmente ter-se-ia obtido um valor mais alto de compostos fenólicos e conseqüentemente maior atividade antimicrobiana.

Outro resultado interessante e que interliga de certa forma os dados apresentados, é o descrito por [63] onde uma espécie da mesma família (*Cistus villosus*) possui uma atividade antifúngica muito interessante com um resultado de 1.56 mg/mL em *Candida albicans*. Isto leva-nos a crer que plantas da família *Cistacea* normalmente têm melhor atividade antifúngica do que antibacteriana.

Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho teve como objetivo estudar as propriedades biológicas e fitoquímicas da *Tuberaria lignosa* acoplado a um processo de multiplicação *in vitro*.

Neste trabalho foi desenvolvido um ensaio (pioneiro para esta espécie) de multiplicação *in vitro* que demonstrou que os tratamentos com luz LED e a citocinina BAP, têm influência positiva no fator de crescimento dos explantes, talvez devido à incidência da luz vermelha e azul. Na influência de novos rebentos, o tratamento com meta-Topolin foi muito positivo, o que indica que pode ser interessante no futuro experimentar um meio de cultura com BAP e meta-Topolin. A *Tuberaria lignosa* apresentou uma percentagem substancial de plantas necróticas, talvez devido ao excesso de nutrientes, sendo este também um indicativo para reduzir a quantidade de micro e macronutrientes nos próximos meios de cultura a testar no futuro.

Relativamente à capacidade antioxidante dos extratos, no ensaio DPPH a hidrodestilação das flores obteve um EC_{50} de $47.256 \pm 0.723 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$, o mais próximo do EC_{50} do padrão Ácido Gálico ($33.393 \pm 1.231 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$). No ensaio do Poder Redutor, o valor de EC_{50} do padrão Ácido Gálico é de $173,88 \pm 8,156 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$ e cinco das extrações realizadas, nomeadamente a hidrodestilação das flores ($105.58 \pm 4,056 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$) a hidrodestilação das folhas ($108.05 \pm 4.522 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$), a infusão ($141,77 \pm 3.146 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$), a decocção ($135.05 \pm 10.827 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$) e etanol 50% ($171.06 \pm 12.078 \mu\text{g}_{\text{extrato}}/\text{mL}$) obtiveram um valor mais baixo de EC_{50} do que o padrão Ácido Gálico. Todos esses cinco extratos têm a parte aquosa em comum, o que muito provavelmente pode indicar uma maior capacidade antioxidante do que o padrão em extratos aquosos de *Tuberaria lignosa*. O extrato da infusão demonstrou ser o melhor no ensaio da Capacidade Redutora Total ($1,916 \pm 0.228 \text{ mmol EAG}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

Os extratos da *Tuberaria lignosa* contêm compostos que inibem tanto o crescimento de bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas como de leveduras, ainda que com impactos distintos. No ensaio da difusão em disco, os extratos aquosos como a hidrodestilação das flores e das folhas foram os que obtiveram resultados mais efetivos. Por exemplo, o halo de inibição do extrato da hidrodestilação das folhas em *Staphylococcus aureus* foi de $20.55 \pm 0.76 \text{ mm}$ (Padrão Tetraciclina- $22.25 \pm 0.5 \text{ mm}$), enquanto o halo de inibição da hidrodestilação das flores em *Candida tropicalis* foi de $15.55 \pm 1.67 \text{ mm}$ (Padrão Anfotericina $21.50 \pm 0.58 \text{ mm}$).

No ensaio de MIC utilizando como indicador de viabilidade a resazurina, o resultado mais positivo foi o da hidrodestilação das folhas em *Candida albicans* ($0.0195 \text{ mg}/\text{mL}$), ainda assim longe da Anfotericina ($0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Estes resultados podem indicar que os extratos da *Tuberaria lignosa* podem ter propriedades antimicrobianas interessantes, como indica o teste da difusão em disco, mas necessariamente em concentrações mais elevadas, como nos indica o ensaio MIC.

No futuro, a *Tuberaria lignosa* provavelmente pode vir a ser utilizada em áreas como a indústria alimentar, a indústria cosmética ou a indústria farmacêutica devido às suas diversas propriedades que apresenta. Desta forma, as indústrias podem recorrer a plantas micropropagadas, sem ter que recorrer ao meio natural, evitando assim risco de extinção de espécies. Este processo de micropropagação aumenta a qualidade fitossanitária da planta, o que pode ser muito interessante em determinadas indústrias como a farmacêutica.

No futuro terão que ser feitos mais testes, nomeadamente de citotoxicidade e *in vivo*, para poder ser comercializado no mercado, contudo foi dado um passo pioneiro nesta espécie, nomeadamente nas propriedades antimicrobianas e no desenvolvimento do ensaio de micropropagação *in vitro*. Existem muitos fatores a melhorar e a explorar em próximos estudos.

O meio de cultura necessita de ser otimizado, baixar a concentração de nutrientes de forma a baixar a taxa de necrose, aumentar o tamanho de explantes e aumentar o fator de multiplicação. Será muito interessante a aplicação de Design Experimental, nomeadamente o design Box-Behnken na formulação de meios de cultura de forma a otimizar e poder estudar mais fatores de crescimento. Na parte da microbiologia, um teste mais aprofundado com mais leveduras além das testadas neste ensaio seria promissor.

A realização dos testes efetuados neste trabalho na planta colhida do meio natural, também seria interessante de realizar-se com a planta resultante da micropropagação, de forma a comparar os compostos antioxidantes e as propriedades antimicrobianas da planta do habitat natural com a planta micropropagada em laboratório. Será também importante fazer uma avaliação da *Tuberaria lignosa* de diferentes locais e em diferentes épocas do ano, para perceber a influência que a zona e a época do ano têm nas propriedades da planta.

Bibliografia

- [1] I. P. Online, M. Rahman, R. Shahriar, N. S. Meghla, T. Ishika, and P. C. Roy, "Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts against Gram positive and Gram negative bacteria in Bangladesh," *Asian J. Med. Biol. Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 405-411, 2017.
- [2] M. Bahmani, H. Shirzad, N. Shahinfard, L. Sheivandi, and M. Rafieian-kopaei, "Cancer Phytotherapy : Recent Views on the Role of Antioxidant and Angiogenesis Activities," *J. Evid. Based Complementary Altern. Md.*, vol. 22, no. 2, pp. 299-309, 2017.
- [3] P. H. S. Cesar, C. H. de Moura Oliveira, S. Marcussi, H. S. C. Pedro, H. de M. O. Carlos, and M. Silvana, "Pharmaco-toxic characterization of the aqueous extract from *Pereskia grandifolia* leaves," *J. Med. Plants Res.*, vol. 9, no. 7, pp. 216-222, 2015.
- [4] M. Friedman, "Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 15, pp. 3805-3822, 2015.
- [5] H. Chandra, P. Bishnoi, A. Yadav, B. Patni, A. Mishra, and A. Nautiyal, "Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review," *Plants*, vol. 6, no. 2, p. 16, 2017.
- [6] A. Kali, "Antibiotics and bioactive natural products in treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A brief review," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 9, no. 17, p. 29, 2015.
- [7] M. Asadi-Samani, M.-T. Moradi, L. Mahmoodnia, S. Alaei, F. Asadi-Samani, and T. Luther, "Traditional uses of medicinal plants to prevent and treat diabetes; an updated review of ethnobotanical studies in Iran," *J. Nephrothol.*, vol. 6, no. 3, pp. 118-125, 2017.
- [8] G. a P. Bevilaqua, G. Schiedeck, and J. E. Schwengber, "Identificação e tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado," *Embrapa.*, vol. 61, p. 29, 2007.
- [9] D. de O. Prudente, "SOMATIC EMBRYOGENESIS, ANTIOXIDANT METABOLISM AND RESERVE MOBILIZATION DURING CRYOPRESERVATION OF *Passiflora ligularis* Juss. ZYGOTIC EMBRYOS", Federal University of Lavras, 2017.
- [10] C. A. Thanos, K. Georghiou, C. Kadis, and C. Pantazi, "Cistaceae: a Plant Family with hard seeds", *Isr. J. Bot.*, vol. 41, pp. 251-263, 1992.
- [11] P. P. Ferrer-gallego, "Typification of two names belonging to the Cistaceae family: *Fumana arabica* and *Helianthemum oelandicum* subsp. *italicum*," *Phytotaxa*, vol. 217, no. 3, pp. 298-300, 2015.
- [12] D. Papaefthimiou, A. Papanikolaou, V. Falara, and S. Givanoudi, "Genus *Cistus* : a model for exploring labdane-type diterpenes ' biosynthesis and a natural source of high value products with biological , aromatic , and pharmacological properties," *Front. Chem.*, vol. 2, pp. 1-19, 2014.
- [13] V. V Ukraintseva, "Pollen Morphology of the Family Cistaceae in Relation to its Taxonomy Poilen morphology of the family Cistaceae in relation to its taxonomy," *Grana*, vol. 3134,

- pp. 33-36, 2009.
- [14] K. Sayah, I. Marmouzi, H. N. Mrabti, Y. Cherrah, M. El, and A. Faouzi, "Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia," *Biomed. Res. Int.*, pp 1-7, 2017.
- [15] B. Guzm and P. Vargas, "Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid rbcL and trnL-trnF sequences," *Org. Divers. Evol.*, vol. 9, pp. 83-99, 2009.
- [16] E. Barraji3n-catal3n *et al.*, "Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity , and cytotoxic activity against human cancer cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48, pp. 2273-2282, 2010.
- [17] J. Alcamí and P. Bermejo, "Phytomedicine Ellagitannins from *Tuberaria lignosa* as entry inhibitors of HIV," *Phytomedicine*, vol. 17, pp. 69-74, 2010.
- [18] J. Pinela, L. Barros, M. Due3as, A. M. Carvalho, C. Santos-Buelga, and I. C. F. R. Ferreira, "Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples: Effects of drying and oral preparation methods," *Food Chem.*, vol. 135, no. 3, pp. 1028-1035, 2012.
- [19] A. Villar, "Studies on the Antiinflammatory and Antiulcerogenic Activities of *Tuberaria Zignosa* Extracts in Experimental Animals," vol. 32, no. 1, pp. 27-32, 1994.
- [20] M. Danival *et al.*, "Comprehensive review on treatment of HIV," *Pak. J. Pharm. Sci.*, vol. 29, pp. 1331-1338, 2016.
- [21] B. Plantarum, L. Centro, C. De, R. Mar, and G. Centro, "Plant Tissue Culture," *Molecular Biomethods Handbook*, no. 2, pp. 875-904, 2008.
- [22] M. In3s, M. Jo3o, R. C. Alves, and I. C. F. R. Ferreira, "Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds : A review," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 82, pp. 9-22, 2016.
- [23] G. R. Rout, S. Samantaray, and P. Das, "In vitro manipulation and propagation of medicinal plants," *Biotechnol. Adv.*, vol. 18, pp. 91-120, 2000.
- [24] S. Korsangruang, N. Soonthornchareonnon, Y. Chintapakorn, P. Saralamp, and S. Prathanturarug, "Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 103, no. 3, pp. 333-342, 2010.
- [25] S. Echeverrigaray, G. Agostini, L. Atti-Serfini, N. Paroul, G. F. Pauletti, and A. C. Atti Dos Santos, "Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 9, pp. 4220-4223, 2001.
- [26] O. L. Gamborg, T. Murashige, T. A. Thorpe, and A. N. I. I. K. Vasil, "PLANT TISSUE CULTURE MEDIA 1," *In Vitro*, vol. 12, no. 7, pp. 473-478, 1976.
- [27] T. Murashige *et al.*, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiol. Plant*, pp. 473-497, vol. 15, 1962.

- [28] Victor M. et al., "*Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*," Biol. Plant, 3^a edition, pp. 50-82, 2013.
- [29] T. Murashige, "PLANT PROPAGATION THROUGH TISSUE CULTURES," Ann. Rev. Physiol., vol. 25, pp. 135-166, 1974.
- [30] J. Azmir *et al.*, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review," *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, pp. 426-436, 2013.
- [31] R. M. Smith, "Extractions with superheated water," *J. Chromatogr. A.*, vol. 25, pp. 31-46, 2002.
- [32] L. V Silva, D. L. Nelson, M. F. B. Drummond, L. Dufossé, and M. B. A. Glória, "Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric," *Food Res Int.*, vol. 38, pp. 1087-1096, 2005.
- [33] M. P. De Santayana, E. Blanco, and R. Jard, "Plants known as *té* in Spain : An ethnopharmaco-botanical review," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 98, pp. 1-19, 2005.
- [34] H. Li, Y. Jiang, and C. Wong, "Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants," *Acta. Biochim. Pol.*, vol. 57, pp. 483-488, 2007.
- [35] T. Delgado, R. Malheiro, J. A. Pereira, and E. Ramalhosa, "Hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels as a source of antioxidants and their potential in relation to other nuts," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 32, no. 3, pp. 621-626, 2010.
- [36] B. Sultana, F. Anwar, and M. Ashraf, "Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts," *Molecules.*, vol. 15, pp. 2167-2180, 2009.
- [37] K. Robards and M. Antolovich, "Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids A Review," *Analytst*, vol. 122, no. 2, p. 11R-34R, 1997.
- [38] E. A. Ainsworth and K. M. Gillespie, "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin - Ciocalteu reagent," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 179337, pp. 875-877, 2007.
- [39] J. A. Kennedy, M. A. Matthews, and A. L. Waterhouse, "Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 53, no. 4, pp. 268-274, 2002.
- [40] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841-1856, 2005.
- [41] P. RM, and W. PA, "Web alert. Physiology and metabolism," *Curr. Opin. Plant. Biol.*, pp 177-178, 2001.
- [42] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review," *J. Funct. Foods*, vol. 18, pp. 820-897, 2015.
- [43] W. Bors, W. Heller, C. Michel, and M. Saran, "Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies," *Methods Enzymol.*, vol. 186, no. C, pp. 343-355, 1990.
- [44] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, and R. Nithyanandam, "Food and Bioproducts Processing A

- review of the antioxidant potential of medicinal plant species,” *Food and Bioproducts Processing*, vol. 9, no. 89, pp. 217-233, 2010.
- [45] A. Nostro, M. P. Germano, V. D. Angelo, A. Marino, and M. A. Cannatelli, “Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 30, pp. 379-384, 2000.
- [46] K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH Å assay : A critical review and results,” *Food Chem.*, vol. 130, no. 4, pp. 1036-1043, 2012.
- [47] T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, and M. Milos, “Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil,” *Food Chem.*, vol. 85, no. 4, pp. 633-640, 2004.
- [48] R. Pulido, L. Bravo, and F. Saura-calixto, “Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, pp. 3396-3402, 2000.
- [49] M. H. Dos Santos, B. L. Batista, S. M. D. S. Duarte, C. M. P. De Abreu, and C. M. C. P. Gouvêa, “Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*),” *Quim. Nova*, vol. 30, no. 3, pp. 604-610, 2007.
- [50] F. Nazzaro, F. Fratianni, and L. De Martino, “Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria,” *Pharmaceuticals*, vol. 6, pp. 1451-1474, 2013.
- [51] Â. Luís, et al., “Stumps of *Eucalyptus globulus* as a source of antioxidant and antimicrobial polyphenols” *Molecules.*, pp. 16428-46, 2014.
- [52] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review \$,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71-79, 2016.
- [53] J. B. Patel, F. C. Tenover, J. D. Turnidge, and J. H. Jorgensen, “Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods”, vol. 68, pp. 1122-1143.
- [54] S. Foerster, V. Desilvestro, L. J. Hathaway, C. L. Althaus, and M. Unemo, “A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*,” *J., Antimicrob. Chemother.*, pp. 1961-1968, 2017.
- [55] V. L. Singleton, J. A. Rossi, and J. Jr, “COLORIMETRY OF TOTAL PHENOLICS WITH PHOSPHOMOLYBDIC-PHOSPHOTUNGSTIC ACID REAGENTS”, University of California, pp. 144-158.
- [56] I. C. F. R. Ferreira, A. Bento, I. Oliveira, A. Sousa, J. Sa, and A. Pereira, “Chemical composition , and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L .) cultivars,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, pp. 1801-1807, 2008.
- [57] K. I. Berker et al, "Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline (FRAP), and ferricyanide reagent," *Talanta*, vol. 72, pp. 1157-1165, 2007.
- [58] Â. Luís, D. M. Neiva, H. Pereira, J. Gominho, F. Domingues, and A. Paula, “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. Crop. Prod.*, vol. 91, pp. 97-103, 2016.
- [59] S. Gonçalves, L. Fernandes, and A. Romano, “High-frequency in vitro propagation of the endangered species *Tuberaria major*,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 101, no. 3, pp. 359-363, 2010.
- [60] C. P. Victório, R. Machado, C. Luiz, and S. Lage, “Qualidade de Luz e Produção de Pigmentos Fotossintéticos em Plantas In Vitro de *Phyllanthus tenellus* Roxb,” *Rev. Bras. Biociências*, vol. 5, pp. 213-215, 2007.
- [61] K. Bayoub, T. Baibai, D. Mountassif, and A. Retmane, “Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains,” vol. 9, no. 27, pp. 4251-4258, 2010.
- [62] Á. Rubio-moraga, et al., “Screening for polyphenols , antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain,” *J. Ethnopharmacol.*, pp. 1-10, 2013.
- [63] H. Bouamama, T. No, J. Villard, A. Benharref, and M. Jana, “Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L . species,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 104, pp. 104-107, 2006.